

19

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Juni 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/48338 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14610

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Dezember 2001 (12.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 61 872.3 12. Dezember 2000 (12.12.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LICHTENBERG-FRATÉ, Hella** [DE/DE];
Hinter Hoben 165, 53129 Bonn (DE).

(74) Anwälte: **HELBING, Jörg** usw.; Patentanwälte, Von
Kreislser Seltling Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/48338 A2

(54) Title: YEAST STRAIN FOR TESTING THE GENO- AND CYTOTOXICITY OF COMPLEX ENVIRONMENTAL CON-
TAMINATION

(54) Bezeichnung: HEFESTAMM ZUR PRÜFUNG DER GENO- UND ZYTOTOXIZITÄT KOMPLEXER UMWELTKONTA-
MINATIONEN

(57) Abstract: The invention relates to modified yeast strains and to methods for constructing yeast strains, as well as to their use
for testing the geno- and/or cytotoxicity of complex environmental contamination.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft modifizierte Hefestämme sowie Verfahren zur Konstruktion dieser Hefestämme
und deren Verwendung zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen.

Hefestamm zur Prüfung der Geno- und Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen

Die Erfindung betrifft modifizierte Hefestämme sowie Verfahren zur Konstruktion dieser Hefestämme und deren Verwendung zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen. Im einzelnen werden Hefestämme, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* Stämme offenbart, in denen die Nukleinsäuresequenzen für Rezeptor- und Reportersignale für geno- und zytotoxische Umweltkontaminationen, wie z.B. das "green-fluorescent" Gen aus *Aequoria victoria* und das "red fluorescent" Gen aus der indopazifischen See-Anemonenspezies *Discosoma*, stabil in das Hefegenom integriert sind. Diese Hefestämme sind als biologische Komponente eines Biosensors einsetzbar, der zur dosisabhängigen geno- und zytotoxischen Substanzprüfung auf verschiedene und insbesondere zinnorganischer Umweltgifte, d.h. die Detektion aller in der Messprobe vorkommenden Schadstoffe, inklusive möglicher toxischer Abbauprodukte geeignet ist.

Hintergrund der Erfindung

Wissenschaftliche Untersuchungen an niederen Tieren ergaben eine extreme Störung des hormonellen und des morphologischen Reproduktionssystems durch den Einfluss von Organozinnverbindungen, die zu Unfruchtbarkeit bis zum Aussterben bestimmter Arten geführt hat. Da die Synthese der Sexualhormone im gesamten Tierreich und auch beim Menschen nach den selben Prinzipien verläuft, kann eine negative Wirkung auf das hormonelle Reproduktionssystem des Menschen nicht ausgeschlossen werden. Bei Säugetieren beeinflusst TBT (Tri-butyl-tin) das Hormongleichgewicht durch Wirkungen auf endokrine Drüsen wie die Hypophyse, die Schilddrüse und die Hormondrüsen der Gonaden. Das Cytochrom-P450 abhängige Aromatase Sys-

tem spielt bei der Umwandlung von männlichen (Androgene), die im weiblichen Geschlecht stets die Vorstufe der weiblichen Geschlechtshormone (Östrogene) sind, eine bedeutende Rolle. In verschiedenen Forschungsstudien wurde nachgewiesen, daß TBT auf der Stufe der Cytochrom-P450 abhängigen Aromatase in den endogenen Steroidstoffwechsel mariner Gastropoden eingreift und die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen hemmt, wie beschrieben in Bettin, R. et al., Phys. Rev. Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics 51:212-219 (1995).

Dasselbe Enzymsystem, das auch als multifunktionelles Oxygenasesystem (MFO-System) bezeichnet wird und bei Mollusken sowie bei Säugern und beim Menschen nachgewiesen wurde, katalysiert sowohl die Aromatisierung zu Östrogenen als auch den Abbau von TBT. Der durch die – wahrscheinlich kompetitive – Hemmung der Cytochrom-P450 abhängigen Aromatase resultierende erhöhte Androgengehalt induziert bei weiblichen Tieren die zusätzliche Ausbildung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, daß die Steroidbiosynthese im gesamten Tierreich nach denselben Prinzipien abläuft, kann eine negative Wirkung von TBT und anderen Organozinnverbindungen auf das Cytochrom-P450 abhängige Aromatase-System höher entwickelter Lebewesen nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise kann die Umweltbelastung mit TBT und anderen Organozinnverbindungen als ein Faktor angesehen werden, der für die kontinuierlich zunehmenden Reproduktionsstörungen im weiblichen Geschlecht sowohl beim Menschen wie auch bei marin- oder limnisch-aquatisch lebenden Tieren verantwortlich ist. In einer vom World Wildlife Foundation, USA, veröffentlichten Studie werden Reproduktionsstörungen sowohl im männlichen als auch im weiblichen Geschlecht bei über 26 Tierarten aus aquatischen Biotopen beschrieben. Es liegen keine systematischen quantitativen und qualitativen Studien zur Akkumulation und Toxizität zinnorganischer Verbindungen im Menschen vor. Alarmierend sind allerdings die *in vitro* Untersuchungen der Arbeitsgruppe Endokrinologie am Institut für Klinische Biochemie in Bonn, wonach das zur Umwandlung von Androgenen

in Östrogene notwendige Enzym Aromatase aus Uterusendothelzellen bereits durch Nanogramm-Mengen komplett inhibiert wird (D. Klingmüller, Institut für Klinische Biochemie, Universität Bonn, persönliche Mitteilung).

Gravierende Effekte von umweltrelevanten Chemikalien auf den Hormonhaushalt und auf die Fertilität im männlichen und weiblichen Geschlecht wurden z.B. für DDE (2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichlorethan; 4,4' DDE), ein Abbauprodukt des landwirtschaftlich verwendeten Pestizids Keltane durch die Entwicklung von Hermaphroditen bei männlichen Alligatoren in einem Seengebiet Floridas, USA beschrieben.

In England ist bei Fischen die Induktion von Sterilität im männlichen Geschlecht durch Nonylphenole nachgewiesen worden. Nonylphenole, deren Jahresproduktion allein in Großbritannien 20.000 Tonnen betragen, werden bei der Kunststoffherstellung eingesetzt und gelangen bei der Produktion und beim Gebrauch von Kunststoffen zunächst in die Abwässer und danach in Oberflächengewässer wie Bäche, Flüsse und Seen. Die Intoxinierung von Menschen mit TMT (Tri-Methy-Tin), einer potenten neurotoxischen Organozinnverbindung, resultierte in Epilepsie, Amnesie und Hippocampusschädigungen, wie beschrieben in Feldmann, R. G. et al. Arch. Neurol. 50:1320-1324 (1993); Kreyberg, S. et al., Clin. Neuropathol. 11:256-259 (1992).

Für TMT und das verwandte TBT wurden ebenso selektiv Hippocampusregionen betreffende neurotoxische Effekte gezeigt, wie beschrieben in Walsh, T. J. et al., Neurobehav. Toxicol. Teratol 4:177-183 (1982); Balaban, C. D. et al., Neuroscience, 28:337-361 (1988) und Tsunashima, K. et al., Synapse 29:333-342 (1998).

Das Biozid Tributylzinn (TBT) gehört nach Auffassung der World Health Organisation (WHO) zu den giftigsten Stoffen, die je hergestellt und in die Umwelt entlassen worden sind. Die Toxizität und Wirksamkeit von TBT ist nur vergleichbar mit der des Dioxin. TBT wird meist als Oxid, Fluorid, Sulfid,

Chlorid oder Acetat produziert und dissoziiert in wässrigen Lösungen unter Bildung eines hydratisierenden Kations, das sich durch hohe Bioverfügbarkeit auszeichnet.

Organozinnverbindungen werden seit Anfang der 50er Jahre, nach Entdeckung ihrer bioziden Wirkung, in der Industrie zur Imprägnierung, Stabilisierung und Konservierung verschiedenster Produkte eingesetzt. Die Hauptanwendungsgebiete von TBT und Triphenylzinn (TPHT) sind der Einsatz in konventionellen Antifoulingfarben mit Kontaktauslaugung, in ablativen Antifoulingfarben und in selbstschleifenden Copolymeren. Organozinnverbindungen werden in großen Mengen als Thermo- und/oder UV-Stabilisatoren bei fast allen PVC-Verarbeitungsverfahren eingesetzt (Kalandrier- und Extrusionsverfahren, Blasformen und Spritzgussverfahren). Dieser Verwendungsbereich ist der mengenmäßig bei weitem bedeutendste, bezogen auf alle Anwendungsbereiche zinnorganischer Verbindungen. Weltweit werden etwa 75.000 t/a an Organozinnsstabilisatoren eingesetzt; in Europa liegt der Verbrauch bei ca. 15.000 t/a, in Deutschland bei etwa 5.000 t/a (Verbrauchszahlen jeweils für das Jahr 1999). Aufgrund ihrer bioziden Wirkung werden diese Chemikalien auch als Holz- und Materialschutzmittel für Textilien, Dichtungs- und Vergussmassen (z. B. Polyurethanschäume), für Anstriche und Klebstoffe sowie mineralische Materialien (z. B. Dämmstoffe) und als Kunststoffstabilisatoren eingesetzt. Organozinnverbindungen werden in der Landwirtschaft, im Gartenbau und in der Tierhaltung als Biozide gegen Pilze, Bakterien, Ameisen, Milben, Nematoden, Insekten, Mollusken und Nagetiere eingesetzt. Außerdem spielt die Anwendung in der Papier- und Brauereiwirtschaft, an Kühltürmen, bei der Lederimprägnierung, in Dispersionsfarben und als Desinfektionsmittel eine Rolle.

Der Mensch kommt durch die vielfältige Anwendung von Organozinnverbindungen auf verschiedene Weise mit diesen Verbindungen in Kontakt. Auswascheffekte führen

- i) zu einer enormen Belastung sowohl küstennaher mariner als auch limnischer Gewässer und Sedimente und damit zur Belastung mariner Lebensmittel (nahrungsbedingte orale Aufnahme) wie beschrieben in Nilsson R. Toxicol Pathol. 28:420-31 (2000);
- ii) zu Einträgen in das Süß- und Sickerwasser und einer kontinuierlichen Belastung der Abwässer. Emissionen von TBT aus imprägnierten Hölzern sowie der Einsatz als Biozide zum Schutz von Textilien, Tapeten, Wandfarbe, Papier, mineralischen Dämmstoffen, Silikon und Polyurethanschäumen führen zu Belastungen der Innenraumluft (inhalative Aufnahme über die Atmung). Direkte Kontaktmöglichkeiten zur Aufnahme über die Haut (percutan) stellen Textilien dar, die zum Schutz des Gewebes mit TBT imprägniert werden.

Die Kontrolle der Abwassereinleitung vor ökotoxischer Belastung erfolgt neben der chemischen Vollanalyse über standardisierte Biotests (DIN, ISO) mit Bakterien, Algen, Kleinkrebsen und Fischen als Indikatororganismen. Organozinnverbindungen werden bisher ausschließlich qualitativ mit gas- oder flüssig-chromatographischen Verfahren nachgewiesen, wie beschrieben in Chiron S. et al., J Chromatogr A. 879:137-45 (2000); Gonzalez-Toledo E. et al., J. Chromatogr A. 878:69-76 (2000); Millan, E., Pawliszyn, J. Chromatogr A. 873:63-71 (2000).

Diese Verfahren sind technisch aufwendig und teuer, der einzige deutsche Anbieter entsprechender Analytik ist die Firma Galab in Geesthacht. Auf der ACHEMA Messe (Juli 2000, Frankfurt) wurde von dem ICB Institut (Münster) in Zusammenarbeit mit der Firma Gerstel der Prototyp eines Gaschromatographen vorgestellt, der zinnorganische Verbindungen nachweisen kann, das einzelne Gerät ist mit 100.000 DM zu veranschlagen und ab etwa Frühjahr 2001 im Handel. Die Empfindlichkeit moderner chemisch-analytischer Methoden für allgemeine Umwelttoxine inklusive der biochemischen (Enzym- und Immunoassays) liegen weit unter der ökotoxischen Wirkungsschwelle.

Bioassays zur Analyse komplexer geno- und zytotoxischer Noxen inklusive zinnorganischer Verbindungen sind bisher nicht im Einsatz.

Zur Detektion von allgemeinen Umweltgenotoxinen werden u. a. zahlreiche prokaryotische Testsysteme eingesetzt. Beispiele sind der AMES-Test (Ames, B.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2281-2285 (1973)) und der bakterielle SOS-Lux-Test (Ptitsyn, L. R. et al., Applied and Environmental Microbiology 63: 4377-4384 (1997) und Horneck, G. et al., Biosensors for Environmental Diagnostics, Teubner, Stuttgart, pp. 215-232 (1998)). Im prokaryotischen Lux-Fluoro-Test werden rekombinante *Salmonella typhimurium* TA1535 Bakterien-Zellen eingesetzt (Rettberg, P. et al., Analytica Chimica Acta 387: 289-296 (1999)).

Die vorhandenen prokaryotischen Biotests zur Detektion von Umwelttoxinen haben die Nachteile, dass

- (i) zeitverzögerte Reaktionen mit dem Absterben der Organismen/Zellen gemessen werden,
- (ii) keine Erfassung all jener Substanzen, die über ihre Interaktionen mit Zellstrukturen in höheren Organismen Mutationen auslösen (z. B. durch Störungen des Spindelapparates),
- (iii) keine genotypisch stabilen differenzierten Rezeptor- und Reporterkomponenten für genotoxische und/oder zytotoxische Agentien enthalten sind, und
- (iv) aktive bakterielle Effluxsysteme für hydrophobe Substanzen nicht ausgeschaltet sind (siehe auch van Ween, H.W. & Konings W.N. Biol. Chem. 378: 769-777 (1997) und Cloeckert, A. & Schwarz, S. Vet. Res. 32:301-310 (2001) und Daly, M. & Fanning, S. Appl. Environ. Microbiol. 66:4842-4848 (2000)).

Ein kürzlich publizierter Biotest zur Bestimmung aquatischer Toxizität beruht auf der Gärleistung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen (Weber, J. et al.,

Z. Umweltchem. Ökotox. 12:185-189 (2000) und Weber et al. Vom Wasser 95:97-106 (2000)). Dieser Vorgang kann jedoch nicht automatisiert vorgenommen werden und dauert etwa 25 Stunden.

Außerdem exprimieren Wildtyp Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine durch die ABC (ATP-binding-cassette = ATP-Bindungs-Kassette)-Transporter Gene *PDR5*, *SNQ2* und *YOR1* vermittelte erhebliche endogene Resistenz gegenüber zinnorganischen Verbindungen sowie einer Vielzahl hydrophober aber auch metallhaltiger Substanzen (Golin, J. et al., Anti-microb. Agents Chemother. 44:134-138 (2000)). Damit sind *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp Stämme für umweltbiotechnologische Zwecke (die Detektion umweltrelevanter Noxen) nicht geeignet. Die Nachteile zur Verwendung der Wildtyp Stämme sind insbesondere:

- (A) kein definierter genetischer Hintergrund,
- (B) metabolische Messparameter unterliegen einer komplexen metabolischen Regulation und zeigen somit nur ungenau mögliche Intoxikationen, da
- (C) die Expression der für die endogene Resistenz verantwortlichen ABC-Transporter die Zellen und damit metabolische Funktionen schützt, und
- (D) somit die Auswertung der erhaltenen Daten in Bezug auf toxikologische Effekte wässriger Lösungen und Substanzen erschwert ist.

Die intensive Verwendung zinnorganischer Verbindungen in einer Reihe industrieller Prozesse mit zunehmender Freisetzung und Akkumulation in der Umwelt ist gegenwärtig Gegenstand erheblicher umweltpolitischer und öffentlicher Besorgnis

Andererseits besteht jedoch seitens der Industrie ein Bedarf an der Verwendung dieser oder ähnlicher Substanzen im Produktionsprozess.

Somit besteht ein dringender Bedarf eines Nachweisverfahrens zur schnellen Erfassung allgemein umweltrelevanter Noxen wie z.B. Organozinnverbindungen, ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung (UV-Strahlung) aber auch chemischer Karzinogene. Die hohe Homologie essentieller zellulärer Vorgänge in Hefe und Zellen höherer Eukaryoten lässt den Schluss zu, dass diese als eukaryotisches Detektions- und Analysesystem zur Identifizierung geno- und zytotoxischer Verbindungen allgemeiner Noxen geeignet sein könnte. Solche Hefestämme könnten in Testreihen für Durchmusterungen möglicher kontaminierter Lösungen in sehr kleinem Maßstab mit hohem Wirkungsgrad (Bioassay) eingesetzt werden.

Zusammenfassung der Erfindung

Die Aufgabe und das Ziel der vorliegenden Erfindung war es, die o.g. Nachteile zu vermeiden und ein eukaryotisches, auf Hefezellen basierendes Testsystem zur dosisabhängigen geno- und zytotoxischen Substanzprüfung umweltrelevanter Noxen und insbesondere zinnorganischer Umweltgifte zu entwickeln. Es wurde nun gefunden, dass ein genetisch definierter (isogener) Hefewirtsstamm, z. B. ein *Saccharomyces cerevisiae* Hefewirtsstamm, in dem geno- und zytotoxische Signalpotenz stabil in das Hefegenom integriert ist und exprimiert wird, ein geeignetes Testsystem ist. Zusätzlich können in dem Hefewirtsstamm Xenobiotikatranslokationsgene, die für die endogene Resistenz verantwortliche ABC-Transportergene kodieren, spezifisch deletiert sein. Dieses Testsystem ermöglicht die Detektion aller in der Messprobe vorkommenden Schadstoffe, inklusive möglicher toxischer Abbauprodukte.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit

(1) einen modifizierter Hefestamm in dem

(a) eine Genotox-Kassette, umfassend einen ersten Promoter und ein erstes Reporterogen, das funktional mit dem ersten Promoter verknüpft ist, und

(b) eine Zytotox-Kassette, umfassend einen zweiten Promoter und ein zweites Reporterogen, das funktional mit dem zweiten Promoter verknüpft ist,

- wobei die Promoter und Reportergene in (1) und (2) voneinander verschieden sind,
- stabil und funktional in das Genom eines Hefewirtsstammes integriert sind;
- (2) eine bevorzugte Ausführungsform von (1), wobei der Hefestamm durch Disruption oder Deletion einer oder mehrerer der in dem Hefewirtsstamm vorhandenen Xenobiotikatranslokationsgene sensibilisiert ist;
- (3) ein Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Hefestamms, wie vorstehend in (1) oder (2) definiert, umfassend das Integrieren einer Genotox- und einer Zytotox-Kassette in den Hefewirtsstamm;
- (4) ein Verfahren zur Detektion umweltrelevanter Noxen, umfassend:
- (a) die Behandlung eines modifizierten Hefestammes, wie vorstehend in (1) oder (2) definiert, mit einer Testsubstanz oder einem Testsubstanzgemisch;
 - (b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Beendigung der Behandlung mit der Testsubstanz/dem Testsubstanzgemisch, und
 - (c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme der Reportergenaktivität des Hefestammes in Anwesenheit oder nach Beendigung der Behandlung mit der Testsubstanz/dem Testsubstanzgemisch;
- (5) Verwendung eines modifizierten Hefestamms, wie vorstehend in (1) oder (2) definiert, zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen; und
- (6) Testkit und Biosensor zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen, umfassend einen modifizierten Hefestamm, wie vorstehend in (1) oder (2) definiert.

Die erfindungsgemäßen modifizierten Hefewirtsstämme sind insbesondere zur dosisabhängigen geno- und zytotoxischen Substanzprüfung verschiedener und insbesondere zinnorganischer Umweltgifte, d.h. die Detektion aller in der Messprobe vorkommenden Schadstoffe, inklusive möglicher toxischer Abbauprodukte, geeignet. Diese Hefezellen - mit stabil in das Genom integrierter Rezeptor- und Reportersignaltropen - sind somit in Testkits und Biosensoren für geno- und/oder zytotoxische Umweltkontaminationen

einsetzbar. Die Zellstruktur (Plasmamembran, intrazelluläre Membransysteme, Zellorganellen, Enzymausstattung) der Hefe gleicht prinzipiell den Zellen höherer Organismen. Wegen der leichteren Kultivierbarkeit (Verdopplungszeit von etwa 90 Minuten) sind Hefezellen jedoch ungleich leichter zu handhaben als etwa Gewebszellen von Säugetieren. Die konstruierten Hefestämme stellen die Basis eines biotechnologischen Analyse- und Durchmusterungssystems dar.

Figurenbeschreibung

Fig. 1: Vektor pUC18pma1.

Fig. 2: Vektor p774.

Fig. 3: Genomisch integrierte Signalpotenz zur Zytotoxizitätsprüfung.

Fig. 4: Genomisch integrierte Signalpotenz zur Genotoxizitätsprüfung.

Fig. 5: Überprüfung der Integration von

- (A) pma1-DsRed1 am Leu2-Locus (Oligonukleotide: leu2int_antisense1/pma1-158_antisense; Positiv: Hefeklone Nr. 2, 3, 4) und
- (B) egfp-URA3 am RAD54-Locus (Oligonukleotide: prerad_sense_int1/ura3_antisense; Positiv: Hefeklon Nr. 3).

Fig. 6: Fotografien des erfindungsgemäßen *S.-cerevisiae*-Hefestamms in Fluoreszenztests von Beispiel 3.3 nach 8 Stunden Inkubation mit (A) 0,05 ng/ml, (B) 0,5 ng/ml Mitomycin C und (C) 0,1 ng/ml, (D) 0,01 ng/ml TPhT.

Fig. 7: Wachstum des erfindungsgemäßen *S.-cerevisiae*-Hefestamms nach 8 Stunden Inkubation in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration im Kulturmedium.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

"Funktional" und "funktional verknüpft" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die entsprechenden Gene so angeordnet sind bzw. so in das Genom der Hefewirtsstämme integriert sind, dass sie – in Abhängigkeit von dem "Schaltzustand" des Promoters - exprimiert werden.

"Stabil integriert" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass bei der mitotischen Vermehrung der Hefestämme das entsprechende Merkmal ohne externen Selektionsdruck immer erhalten bleibt und an die Nachkommenschaft weitergegeben wird.

Der modifizierte Hefestamm gemäß Ausführungsformen (1) und (2) der Erfindung ist insbesondere ein Hefestamm der Ordnung *Ascomycota*, besonders bevorzugt ein Hefestamm der Gattungen *Saccaromycetales*, *Candidaceae* oder *Kluyveromyces*. Hiervon sind die Hefen der Gattung *Saccharomycetales*, insbesondere die der Familie *Saccharomycetaceae*, besonders bevorzugt. Geeignete *Saccharomycetaceae* sind die Spezie *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces uvarum*, wobei *S. cerevisiae* bevorzugt ist.

"Verschiedene Reportergene" bedeutet, dass die beiden exprimierten Reporter bei gemeinsamer Expression in dem modifizierten Hefestamm identifizierbar und quantifizierbar sind.

"Verschiedene Promotoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die in der Genotox- und in der Zytotox-Kassette eingesetzten Promotoren unabhängig voneinander durch genotoxische bzw. zytotoxische Agentien induzierbar sind und die Expression der jeweiligen mit ihnen funktionell verknüpften Reportergene ermöglichen.

Der in der Genotox-Kassette vorhandene erste Promoter ist vorzugsweise ein Promoter der durch genotoxische Agentien induziert wird und Reparaturmechanismen ansteuert, die als Folge von primären DNS-Schäden aktiviert werden. Dazu zählen sowohl heterologe Promotoren, wie z. B. der prokaryotische SOS Promotor (Oda, Y., *Mutat. Res.* 147:219-229 (1985) und Reiferscheid, G., et al., *Mutat. Res.* 253:215-223 (1991)), als auch homologe Promotoren zur Regulation von Gen- oder Zellreparaturgenen. In der vorliegenden Erfindung wird in der Genotox-Kassette vorzugsweise ein homologer Promoter, insbesondere ein Promoter der RAD-Gene (wie RAD54,

RAD26 und RDH454, wobei die in SEQ ID NOs: 1 bis 3 gezeigten RAD54-, RAD26- und RDH54-Promoter besonders bevorzugt sind) oder der Heat-Schock-Gene (wie HSP70 und HSP82, wobei die in SEQ ID NOs:4 und 5 gezeigten HSP70- und HSP82-Promoter besonders bevorzugt sind) eingesetzt.

Der in der Zytotox-Kassette vorhandene zweite Promoter ist vorzugsweise ein Promoter, der die konstitutive Expression von Haushaltsgenen reguliert und durch zytotoxische Agenzien deaktiviert wird. Es sind sowohl heterologe als auch homologe Promotoren einsetzbar. In der vorliegenden Erfindung wird in der Zytotox-Kassette vorzugsweise ein homologer Promoter, insbesondere ein Promoter eines Tubulins (wie α -Tubulin-Promoter einschließlich TUB1- und TUB3-Promoter, wobei die in SEQ ID NOs:6 und 7 gezeigten TUB1 und TUB3-Promoter besonders bevorzugt sind) oder eines Stoffwechselenzyms (wie PMA1-, PMA2- und H^+ -ATP-ase-Promoter, wobei die in SEQ ID NOs:8 und 9 gezeigten PMA1- und PMA2-Promoter besonders bevorzugt sind) eingesetzt.

Das erste und zweite Reporterogen kann jedes beliebige Reporterogen sein, vorausgesetzt, dass die beiden Reporterogene nicht interferieren, d. h. getrennt nachgewiesen werden können. Geeignete Reporterogene sind z. B. Fluoreszenzmarker (z. B. das Green Fluorescent Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*, Red Fluorescent Protein, wie aus der indopazifischen Seeanemonenspezies *Discosoma* bzw. für die Verwendung in Hefen adaptierte Mutanten hiervon), Enzyme (insbesondere solche, die von der Hefe sezerniert und dann mittels Farbreaktion nachgewiesen werden können wie Peroxidasen, Esterasen und Phosphorylasen) oder Antigene (die durch Immunoassays nachgewiesen werden können wie c-myc und Hab). Besonders bevorzugt ist die Verwendung von zwei nicht interferierende Fluoreszenzmarkern.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die beiden Reporterogene Nukleinsäuresequenzen, die für das "green-fluorescent" Gen aus

Aequorea victoria oder Mutanten hiervon sowie für das "red fluorescent" Gen aus der indopazifischen Seeanemonenspezies *Discosoma* oder eine Mutante hiervon kodieren. Besonders bevorzugt sind die Mutanten der fluoreszierenden Proteine, die von den in SEQ ID NO:10 und 12 gezeigten DNA-Sequenzen kodiert sind. Die Genotox- und Zytotox-Kassetten können weitere funktionelle DNA-Sequenzen/Gene aufweisen wie z. B. Selektions-/Markergene (nachfolgend auch "selektierbare Marker"), die u. a. zur Selektion auf erfolgte Integration dienen können, sowie Rekombinase-Erkennungssequenzen und Spleißstellen, die zum Entfernen von unerwünschten Abschnitten in der eingeführten Kasette wie z. B. der Selektions-/Markergene dienen.

Die selektierbaren Marker können dabei sowohl Auxotrophie-Marker wie die Auxotrophiemarker URA3 (siehe SEQ ID NO:14) und LEU2 oder Gene, die eine Resistenz z.B. gegen G418 (Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen) bewirken.

Gemäß der Ausführungsform (2) des Hefestammes sind ein oder mehrere der in dem Hefewirtsstamm vorhandenen Xenobiotikatranslokationsgene, die zur Ausschleusung toxischer Substanzen notwendig sind, deletiert bzw. disruptiert. Solche Translokationsgene (auch "ABC-Transportergene" genannt) sind in den nachfolgenden Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tabelle 1

Das komplette Hefegenom kodiert für 29 ABC Gene

PROTEIN	GENBANK ACCESSION	CHR	GRÖÖE	TMS	TOPOLOGIE	BEKANNTE FUNKTION	ANDERE NAMEN
ADP1	X59720	III	1049	10	TM-NBD-TM		YCR011
OR26.01	X87331	XV	1006	12	TM-NBD-TM		
PDR5	L19922	XV	1511	14	(NBD-TM) ₂	Cycloheximid und Multidrug Resistenz	STS5 YDR1
PDR10	Z49821	XV	1564	14	(NBD-TM) ₂		YIL013YIB Y1329919
PDR11	Z47047	IX	1411	15	(NBD-TM) ₂		LPE14
PDR12	U39205	XVI	1511	12	(NBD-TM) ₂		D950924
PDR15	U32274	IV	1529	14	(NBD-TM) ₂		YD811916
SNQ2	Z48008	IV	1501	12	(NBD-TM) ₂	4-NQO und Multidrug Resistenz	
YNR070	Z71685	XIV	1333	12	(NBD-TM) ₂		
O1125		XV	1095	13	(NBD-TM) ₂		
ATM1	Z49212	XIII	690	5	TM-NBD	Erhaltung mitochondrialer DNA	MDY YM995203
L1313	X91488	XII	1559	17	(NBD-TM) ₂		
MDL1	U17246	XII	696	6	TM-NBD		
MDL2	L16993	XVI	812	5	TM-NBD		SSH1
STE6	Z28209	XI	1290	12	(NBD-TM) ₂	α-Faktor Export	YKL209
YCF1	Z48179	IV	1515	17	(NBD-TM) ₂	Cadmium und Dia Resistenz	YD930211
YHL035	U11583	VIII	1592	16	(NBD-TM) ₂		
YKR103/104	Z28328	XI	1524	17	(NBD-TM) ₂	Mögliches Pseudogen	
YOR1		VII	1477	15	(NBD-TM) ₂	Oligomycin Resistenz	
L0705		XII	1661	20	(NBD-TM) ₂		
GCN20	D50617	VI	752	0	NBD-NBD	Interagiert mit tRNA	YFR009
YEF3	U20865	XII	1044	3	NBD-NBD	Stimulation Bindung Aminoacyl-tRNA	TLJ3EFC1 196725
YER036	U18796	V	610	0	NBD-NBD		
YDR087		IV	608	4	NBD-NBD		
YNL014	Z71290	XIV	1044	3	NBD-NBD		
RR1196		XVI	1196	3	NBD-NBD		
PAL1	L34491		870	5	TM-NBD	Oleat Oxidation	SSH2 PXA1
YKL185	Z28188	XI	853	6	TM-NBD	Mögliche Interaktion mit PAL1	YKL741

Tabelle 2

Klassifizierung und exemplarische Beispiele verschiedener klinisch relevanter Antibiotika Transporter

(1-11): m�r aktive nsporter	#3.1.(1-70): ABC ATP Binding Cassette	#3.1.35. DrugE1 Drug Exporter-1	MsrA <i>S. epidermidis</i> (ery)		
		#3.1.47. DrugE2 Drug Exporter-2	LmrA <i>L. lactis</i> (drugs)		
		#3.1.61. MDR Multi Drug Resistance			MDR1 <i>H. sapiens</i> (Phosphol.; fq, lm, ml, rif, tet)
		#3.1.65 PDR Pleiotropic Drug Resistance		Pdr5 <i>S. cerevisiae</i> (azo, chl, ery, lm, tet) Snq2 <i>S. cerevisiae</i> (azo) CDR1 <i>C. albicans</i> (azo, chl) AtrA, B <i>A. nidulans</i> (ag, azo)	
		#3.1.67 CT1 Conjugate Transporter-1		Ycf1 <i>S. cerevisiae</i> (Konjugate)	
		#3.1.68 CT2 Conjugate Transporter-2		Yor1 <i>S. cerevisiae</i> (ery, tet)	MRP1-6 <i>H. sapiens</i> (Konjugate, Phosphol. fq)

Bei den Xenobiotikatranslokationsgenen, die deletiert bzw. disruptiert werden, handelt es sich u. A. um PDR5, YOR1, SNQ2, YCF1, PDR10, PDR11 und PDR12. Bevorzugt ist dabei, dass wenigstens das PDR5-Gen deletiert ist, besonders bevorzugt ist ein modifizierter, isogener *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefewirtsstamm mit Deletionen in den PDR5-, YOR1- und SNQ2-Genen.

Das Verfahren gemäß Ausführungsform (3) der Erfindung umfasst das Einführen der Kasette in das Hefegenom. Die Hefetransformation kann entsprechend der Lithium-Acetat Methode, wie von Rothstein, R. in *Methods in Enzymology* 194: 281-302 (1991) beschrieben, erfolgen. Hefegenetische Methoden, insbesondere für *Saccharomyces cerevisiae* erfolgen entsprechend der bei Sherman, F. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1981) beschriebenen Methode, die Kreuzung der modifizierten Stämme und Isolieren der diploiden Stämme durch Mikromanipulation umfasst. Die Integration wird dabei vorzugsweise mittels der vorstehend erwähnten selektiven Marker (Auxotrophie und/oder Resistenzen) verfolgt. Im einzelnen werden die Marker enthaltenden Kassetten eingeführt, die nachfolgende Kreuzung führt zum Erhalt isogener Stämme und Auswahl derjenigen Stämme, welche nach Transformation eine stabile Integration der gewünschten Kassetten in das Hefegenom aufweisen (z.B. im Falle des Plasmids *p774pma1Dsred* und der DNS Kasette *rad54::egfp* erfolgt eine Anzucht in Kulturmedien und eine Auswahl der Stämme, die ohne die Zusätze von Leucin und Uracil wachsen).

Zum Erhalt des *pdr5yor1snq2* dreifach-mutanten Hefewirtsstammes, z. B. des *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefewirtsstammes, können die Gene durch Einführung eines oder mehrerer selektierbarer Marker (Auxotrophie und/oder Resistenzen) deletiert und/oder disruptiert werden.

Die selektierbaren biosynthetischen Markergene (Auxotrophiebedürfnisse und/oder Resistenzen) können durch rekombinante DNS-Techniken in die Loci der Wildtyp-Kaliumtransportergene eingeführt werden. Geeignete se-

lektierbare Marker sind vorstehend genannte Auxotrophie- und Resistenzmarker. Solche modifizierten Allele können dann in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert werden, wo sie durch homologe Rekombination die Wildtyp-Loci ersetzen. Die Stämme mit modifizierten Allele können durch Selektion auf den oder die biosynthetischen Marker ermittelt werden.

Die in die Loci der unspezifischen Translokationssysteme eingeführten selektierbaren biosynthetischen Marker stellen außerdem einen einfachen Weg zum Transfer dieser Mutationen in genetisch andere Linien dar (Kreuzung). Ein Stamm, der eine Mutation in einem der Xenobiotikatranslokationsgene (z.B. PDR5 oder YOR1 oder SNQ2) beinhaltet, kann mit einem Stamm des entgegengesetzten Paarungstyps, der eine Mutation in einem anderen Xenobiotikatranslokationsgen (z.B. PDR5 oder YOR1 oder SNQ2) trägt, zu Diploiden gekreuzt werden. Durch anschließende Sporulation zu Haploiden (Tetradenanalyse) kann die isogene Nachkommenschaft dann auf die Anwesenheit der biosynthetischen Marker hin selektiert werden. Der *pdr5yor1snq2* dreifach-mutante *Saccharomyces-cerevisiae*-Phänotyp kann durch Wachstumstests auf selektiven Kulturmedien mit z. B. Ketokonazol-konzentrationen von 100 µM oder weniger ermittelt werden. Ein erfindungsgemäßer Hefestamm kann durch einen Test ermittelt werden, bei dem analysiert wird, ob eine Substanz den *pdr5yor1snq2* dreifach-mutanten *Saccharomyces-cerevisiae*-Phänotyp intoxiniert. Dazu wird der zu prüfende Stamm durch Wachstumstests auf selektiven Kulturmedien mit der Substanz inkubiert. Diese einfachen Verfahren, in denen Wachstumsveränderungen durch Agarplattentests und/oder in Flüssigkultur beobachtet werden kann, können somit spezifisch wirksame Substanzen detektieren, die metabolische Funktionen oder morphologische Veränderungen modulieren. Zur Prüfung verschiedener Substanzen oder Lösungen kann das Durchmusterungsverfahren solche Veränderungen wie metabolische Aktivität oder verminderte Wachstumsrate beinhalten. Die Testsubstanzen, die im Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren eingesetzt werden, können z.B. syntheti-

sche oder natürliche Produkte sein. Natürliche Produkte beinhalten pflanzliche, tierische oder mikrobielle Extrakte.

Gemäß Ausführungsform (4) betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Detektion umweltrelevanter Noxen, das heißt eine Verfahren zur dosisabhängigen geno- und zytotoxischen Substanzprüfung, insbesondere auf zinnorganische Umweltgifte. Hierbei werden die erfindungsgemäßen Hefestämme in einer Nährlösung, vorzugsweise einer YNB-Nährlösung (1,7 g/l Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren), 5 g/l NH_4SO_4 , 2 % D-Glucose, 0,5g/l Aminosäure-Mix (bestehend aus 250 mg Adenin, 500 mg Tryptophan, 100 mg Arginin, 100 mg Methionin, 150 mg Tyrosin, 150 mg Lysin, 300 mg Valin, 500 mg Threonin, 500 mg Serin, 250 mg Phenylalanin, 100 mg Asparagin, 10 mg Glutaminsäure, 100 mg Histidin)), bei pH 5,6 bis 5,9 bei 25 bis 35 °C, vorzugsweise 30 °C; 12 – 18 h unter Schütteln und Belüften vorinkubiert. Aliquots dieser vorinkubierten Lösung, die 1×10^5 bis 1×10^7 Hefezellen pro ml enthalten, werden mit bis zu 1 Vol.-% einer wässrigen Lösung der zu prüfenden Substanz bzw. bis zu 0,1 Gew.-% der zu prüfenden Substanz als Feststoff in Kontakt gebracht, unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen der Vorinkubation bebrütet (ca. 5 - 20 h) und die Auswirkung auf die Reporterpotenzen in den bebrüteten Hefekulturen nachgewiesen. Falls erforderlich kann – bei positiven Befund – ein Abgleich mit einer Referenzprobe mit bekannter Noxenkonzentration erfolgen. Der Nachweis erfolgt spezifisch für die in dem modifizierten Hefestamm vorhandenen Reporter. Bei einem Reportersystem mit den vorstehend erwähnten "green" und "red fluorescent protein" erfolgt der Nachweis durch Messung der Fluoreszenzintensität bei 508 und 583 nm. Eine detaillierte Beschreibung für einen Test mit einem Hefestamm mit einem solchen Reportersystem ist in Beispiel 4 gegeben.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung einen Testkit und einen Biosensor (nachfolgend auch "Biotest"), umfassend die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Hefezellen, insbesondere *Saccharomyces-cerevisiae*-Zel-

len. Dieser Biotest ist leicht zu handhaben und stellt eine wenig aufwendige Nachweismethode zur Erfassung geno- und zytoxischer Wirkungen komplexer Stoffgemische in wässrigen Lösungen bereit. Methodisch ist eine sterile Arbeitsweise nicht erforderlich. Der konstruierte hypersensitive, geno- und zytotoxisch signalgebende Hefestamm kann als biotechnologisches Hochdurchsatz-Testsystem zur konzentrationsabhängigen Detektion komplexer Umweltkontaminationen sowie insbesondere zinnorganischer Verbindungen in Lösungen eingesetzt werden.

Diese Technologie hat ein breites Einsatzspektrum zur Detektion umweltrelevanter Noxen in der Gesundheitsvorsorge für den Menschen als:

1. Frühwarnsystem in der Wasserüberwachung,
2. ökotoxikologische Bewertung von Abwässern,
3. Biotest in der Ökotoxikologie,
4. Funktionsüberwachung von Kläranlagen,
5. in der Medizin zum Toxizitätsscreening für Arzneimittel und Substanzen, und
6. in der Industrie zur Überwachung der im Produktionsprozess verwendeten Lösungen.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Testverfahrens besteht dabei

- i) im Hinblick auf die Empfindlichkeit, mit der das aktive Material identifiziert werden kann,
- ii) die Anzahl der Proben die getestet werden können sowie
- iii) in der Schnelligkeit (8 Stunden), in der der Test durchgeführt werden kann,
- iv) in der nicht-sterilen methodischen Durchführung des Tests, und
- v) in der möglichen parallelen Detektion von geno- und zytotoxischen Effekten durch differenzierte Signale.

Die biotechnologische Verwendbarkeit stabil Geno- und Zytoxizität detektierender, gut wachsender Hefestämme besteht in der frühzeitigen Detektion

gesundheitsgefährdender Umweltbelastungen sowie zur Abschätzung des Risikos für die Gesundheit des Menschen als: i) Frühwarnsystem in der Wasserüberwachung, ii) ökotoxikologische Bewertung von Abwässern, iii) Biotest in der Ökotoxikologie, iv) Funktionsüberwachung von Kläranlagen, v) in der Medizin zum Toxizitätsscreening für Arzneimittel und Substanzen, und vi) in der Industrie zur Überwachung der im Produktionsprozess verwendeten Lösungen, da Hefen in auf Wachstum basierenden Testreihen für Durchmusterungen vieler verschiedener Testlösungen in sehr kleinem Maßstab und mit hohem Wirkungsgrad ("Screening"-Verfahren in Mikrotiterschalen) verwendet werden können.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung noch ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren der exprimierten Reportergene, z.B. der pma1-Dsred1- und rad54::egfp-Reportergene, umfassend:

- (a) die Behandlung eines Hefewirtsstamms, insbesondere eines *Saccharomyces cerevisiae* Hefewirtsstamms, in dem Rezeptor- und Reportersignalpotenzen für geno- und/oder zytotoxische Umweltkontaminationen wie vorstehend definiert stabil in das Genom integriert sind, aber nicht die der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eigenen PDR5, SNQ2 oder YOR1 Xenobiotikatranslokations-Systeme exprimiert sind, mit Testsubstanzen,
- (b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz, und
- (c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme der Reportergenexpression, z.B. die Fluoreszenzintensität dieses Stammes in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

Beispiele

Allgemeine Methoden

Rekombinante DNA-Technik: Zur Anreicherung und Manipulation von DNS wurden Standardmethoden benutzt, wie sie bei Sambrook, J. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), beschrieben sind. Die verwendeten molekularbiologischen Reagenzien wurden nach den Angaben der Hersteller eingesetzt.

Hefetransformation: *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämme wurden entsprechend der Lithium-Acetat Methode, wie von Rothstein, R. in Methods in Enzymology 194: 281-302 (1991), beschrieben, transformiert.

Hefegenetische Methoden: *Saccharomyces-cerevisiae*-Stämme wurden entsprechend der bei Sherman, F. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1981) beschriebenen Methode gekreuzt und diploide Stämme durch Mikromanipulation isoliert.

Primer: Genbank Accession SCYGL163C, 4837 bp, Chromosom VII, Lese-rahmen YGL163c, deponiert 11. August 1997:

Oligonukleotid postrad_sense (SEQ ID NO:17):

5' GAG AGC TAG CAG ACT CGA GCT CTT ACA TAC ATG TAC TTA TAA AAC 3',
Position 380 – 406 in der genomischen Sequenz, wobei die aus klonierungstechnischen Gründen angefügten Nukleotide kursiv dargestellt sind und die zum Erhalt einer *Xho*-I-Schnittstelle eingefügten Nukleotide unterstrichen dargestellt sind.

Oligonukleotid postrad_antisense (SEQ ID NO:18):

5' GAG AGG TAC CAG TTA AAG TTA ATC CTT CTG AGA G 3',
Position 18 – 51 in der genomischen Sequenz, wobei die aus klonierungstechnischen Gründen angefügten Nukleotide kursiv dargestellt sind und die zum Erhalt einer *Kpn*-I-Schnittstelle eingefügten Nukleotide unterstrichen dargestellt sind.

Oligonukleotid prerad_sense SEQ ID NO:19):

5' GAG AGC GGC CGC CTC ATA CTC GAG GGA AAT TCG 3',

Position 4378 – 5357 in der genomischen Sequenz, wobei die aus klonierungstechnischen Gründen angefügten Nukleotide kursiv dargestellt sind und die zum Erhalt einer *Not* I Schnittstelle eingefügten Nukleotide unterstrichen dargestellt sind.

Oligonukleotid prerad_antisense (SEQ ID NO:20):

5' GAG AGG ATC CGG TAA TCT GCG TCT TGC **CAT** CAG 3',

Position 3084 – 3106 in der genomischen Sequenz, wobei die aus klonierungstechnischen Gründen angefügten Nukleotide kursiv; die zum Erhalt einer *Bam*-HI-Schnittstelle eingefügten Nukleotide unterstrichen und das Startcodon des *RAD54* Gens (als inverses Komplement) fett gedruckt dargestellt sind.

Oligonukleotid pma1-158_antisense (SEQ ID NO:21):

5' CGG CTG GTT CTA 3',

entspricht Position 170 – 157 in der 939 bp deponierten Sequenz DNA des „promotor binding protein,, Gens (Genbank Accession YSCHATPASA, M25502).

Oligonukleotid LEU2int_antisense (SEQ ID NO:22):

5' GTC GAC TAC GTC GTT AAG GCC G 3',

entspricht Position 92511 – 92489 in der 316613 bp deponierten DNA Sequenz des LEU2 Gens (Genbank Accession NC_001135, GI:10383748, *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III, complete chromosome sequence).

Oligonukleotid prerad_sense_int1 (SEQ ID NO:23):

5' ACA AAG CTC CTC TCC TGC TCA AG 3',

Position 4503 – 4481 in der *RAD54* Gensequenz (Genbank Accession SCYGL163C, Z72685, Y13135),

Oligonukleotid ura3_antisense (SEQ ID NO:24):

5' ACT AGG ATG AGT AGC AGC ACG T 3',

Position 267 – 245 in der *URA3* Gensequenz (Genbank Accession 406851).

Beispiel 1: Konstruktion des Dsred Integrationsplasmids zur zytotoxischen Signalgebung

Konstruktion des Plasmids p774pma1Dsred: Zur Transkription des "Red-fluorescent-protein"-Gens in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde der hefe-eigene Promotor der Plasmamembran ATPase *PMA1* verwendet. Der in *Saccharomyces cerevisiae* konstitutiv aktive *pma1* Promotor wurde als *Eco* RI/*Bam* HI 0.93 kb Fragment aus dem Plasmid pRS408 (erhalten von Dr. A. Goffeau, Université Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgien) nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese isoliert. In einer Ligation wurde das 0.93 kb *pma1 Eco* RI/*Bam* HI Fragment mit dem *Eco* RI/*Bam* HI gespaltenem Plasmidvektor pUC18 ligiert. Das erhaltene Plasmid pUC18-pma1 (s. Fig. 1) wurde durch Restriktionskartierung und Sequenzierung bestätigt.

Aus dem Plasmid pDsRed1-N1 (Clontech; SEQ ID NO:16) wurde das „Red fluorescent protein“, Gen (Start Codon 679-681, Stop Codon 1357-1359) mit der Restriktionsendonuklease *Not* I an Position 1361 gespalten, das linearisierte Plasmid als 4.7 kb Fragment in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus der Gelmatrix eluiert. Die durch den Restriktionsverdau überstehenden Nukleotide der *Not* I Schnittstelle wurden in einer anschließenden DNA-Polymerase Enzym-Reaktion (Klenowfragment) mit 0.1 mM freien Nukleotiden (dNTPs) in 5'>3' Richtung zum Erhalt glatter Enden aufgefüllt. In einem weiteren Schritt wurde das lineare 4.7 kb pDsRed1-N1 Fragment mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI an Position 661 gespalten. Durch Agarosegelelektrophorese wurde das *Bam* HI/(*Not* I aufgefüllt) 0.7 kb Fragment mit dem "Red-fluorescent-protein"-Gen aufgetrennt und aus der Gelmatrix eluiert. Dieses Fragment wurde mit dem pUC18-pma1 *Bam* HI/*Hinc* II gespaltenem Vektor ligiert, in Bakterien (*E. coli* XL1-Blue, Stratagene) transformiert, und die nach Inkubation bei 37° C erhaltenen Kolonien analysiert. Durch Sequenzierung sowie eine *Eco* RI/*Hind* III Restriktionskartierung isolierter Plasmid-DNA und nachfolgender Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese wurde das 1,63 kb *pma1-DsRed1* Verbundfragment bestätigt.

Das pUC18-*pma1*-Ds-Red1 Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sac* I in der Polylinkerregion stromaufwärts des kombinierten *pma1*-*DsRed1* Fragments gespalten, als lineares 4,31 kb Fragment in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus der Gelmatrix eluiert. Die durch den Restriktionsverdau überstehenden Nukleotide der *Sac* I Schnittstelle wurden in einer anschließenden DNA-Polymerase Enzym-Reaktion (Klenowfragment) mit 0.1 mM freien Nukleotiden (dNTPs) in 5'>3' Richtung zum Erhalt glatter Enden aufgefüllt. In einem weiteren Schritt wurde das lineare 4.31 kb pUC18-*pma1*-Ds-Red1 Fragment mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III in der Polylinkerregion stromabwärts des kombinierten *pma1*-*DsRed1* Fragments gespalten und dieses als 1,63 kb Fragment durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus der Gelmatrix isoliert.

Das Plasmid p774 (Connelly & Heiter (1996) Cell 86, 275-285; erhalten von Dr. P. Ljungdahl, Ludwig Institute of Cancer Research, Stockholm, Schweden; s. Fig. 2) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Sma* I/*Hind* III gespalten. Dieser lineare 6,6 kb Vektor wurde mit dem 1,63 kb *pma1*-*Ds-Red1* Verbundfragment ligiert, in Bakterien transformiert und die nach Inkubation bei 37° C erhaltenen Kolonien analysiert. Durch eine *Bam* HI/*Sal* I Restriktionskartierung isolierter Plasmid-DNA und nachfolgender Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese wurde durch den Erhalt dreier Fragmente (6.6 kb p774, 0.93 kb *pma1* Promotor, 0,7 kb "Red-fluorescent-protein"-Gen) die Klonierung des kombinierten 1,63 kb *pma1*-*DsRed1* Verbundfragments in p774 bestätigt. In Figur 3 ist eine schematische Darstellung des Plasmidkonstruktes welches zur Integration der zytotoxischen Signalgebung verwendet wurde dargestellt. Mit Hilfe des Vektors p774-*pma1*-DsRed1 wurde das "Red-fluorescent-protein"-Gen unter Kontrolle des hefe-eigenen ATPase-*pma1*-Promotors stabil in den Genlocus für den biosynthetischen Marker LEU2 des *Saccharomyces cerevisiae* Hefewirtsstamms integriert.

Beispiel 2: Konstruktion der Rad54/gfp/URA3 Integrationskassette zur genotoxischen Signalgebung

Konstruktion des Plamids pBSK-rad54-gfp-URA3: Zur Integration der genotoxischen Signalgebung wurde zunächst ein 1,841 kb DNA Fragment, bestehend aus dem Gen für das "Green fluorescent protein" in der "yeast enhanced version" – *egfp* – mit nachfolgendem selektierbarem biosynthetischem *Saccharomyces cerevisiae* URA3 Marker-Gen, kodierend für die Orotidine-5'-phosphate Decarboxylase aus dem Plasmid pBSK-tok-*egfp*-URA3 (erhalten von Dr. Jost Ludwig, MNF, Universität Tübingen) durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* HI und *Xho* I und Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem *Bam* HI und *Xho* I gespaltenem Plasmidvektor pBSKII (Stratagene) ligiert, in Bakterien (*E. coli* XL1-Blue, Stratagene) transformiert und die nach Inkubation bei 37° C auf LB-Amp (Luria-Bertani-Medium, 100µg/ml Ampicillin) Agarplatten erhaltenen Kolonien analysiert. Durch *Bam* HI/*Xho* I Restriktionskartierung isolierter Plasmid-DNA wurde das inserierte *egfp*-URA3 Fragment (1,84 kb) in pBSKII (2,96 kb) bestätigt.

Aus dem *Saccharomyces cerevisiae* Wildstamm S288C (ATCC, USA) wurde genomische DNA mit Standardmethoden isoliert. 20 pg dieser chromosomalen DNA wurden für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (MBI Fermentas) und den Oligonukleotidprimern *postrad_sense* und *postrad_antisense* zur Amplifikation der 3' nicht-kodierenden Region des *S. cerevisiae* *RAD54* Gens eingesetzt.

Die durch die PCR amplifizierte DNA wurde als 0,4 kb Fragment durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus der Gelmatrix isoliert. Diese DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn* I/*Xho* I gespalten, durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus der Gelmatrix isoliert und mit dem *Kpn* I/*Xho* I linearisierten Plasmidvektor pBSK-*egfp*-URA3 (4,82 kb) ligiert. Nach Transformation in Bakterien (*E. coli* XL1-Blue, Stratagene) und Inkubation bei 37° C auf LB-Amp (Luria-Bertani-Medium, 100 µg/ml Ampicillin,

[Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]) Agarplatten wurden die erhaltenen Kolonien analysiert. Durch eine *Xho* I/*Kpn* I Restriktionskartierung isolierter Plasmid DNA und Auftrennung im Agarosegel wurde das 2,26 kb *egfp-URA3-postrad54* Verbundfragment in pBSKII (2,96 kb) bestätigt.

Aus dem *Saccharomyces cerevisiae* Wildstamm S288C (ATCC, USA) wurde genomische DNA mit Standardmethoden isoliert. 20 pg dieser chromosomalen DNA wurden für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (MBI Fermentas) und den Oligonukleotidprimern *prerad_sense* und *prerad_antisense* zur Amplifikation der 5' nicht-kodierenden Region des *S. cerevisiae RAD54* Gens plus des Startcodons und eines weiteren eingesetzt.

Das durch die PCR amplifizierte DNA-Fragment wurde als 1,3 kb Fragment durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus der Gelmatrix isoliert. Diese DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* HI/*Not* I gespalten, durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus der Gelmatrix isoliert und mit dem *Bam* HI/*Not* I linearisierten 5,2 kb Plasmidvektor pBSK-*egfp-URA3-postrad54* ligiert. Nach Transformation in Bakterien (*E. coli* XL1-Blue, Stratagene) und Inkubation bei 37 °C auf LB-Amp (Luria-Bertani-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) Agarplatten wurden die erhaltenen Kolonien analysiert. Durch eine *Not* I/*Kpn* I Restriktionskartierung isolierter Plasmid DNA und Auftrennung im Agarosegel wurde das 3,5 kb *prerad54-egfp-URA3-postrad54* Verbundfragment in pBSKII (2,96 kb) bestätigt.

In Figur 4 ist eine schematische Darstellung des zur Integration in das *S. cerevisiae*-Genom verwendeten *prerad54-egfp-URA3-postrad54* DNA Konstrukts gegeben. Mithilfe der *rad54* nicht-kodierenden Sequenzen dieser Kassette wurde das *egfp-URA3* Verbundfragment zielgerichtet durch homologe Rekombination stabil in den Genlocus des *S. cerevisiae-RAD54*-Gens

auf Chromosom VII integriert. Dadurch ist der gesamte *RAD54* kodierende Leserahmen durch das *egfp-URA3* Verbundfragment ersetzt. Die nicht gentechnisch veränderten *RAD54* Promotor Steuerelemente regulieren die Expression des "Green-fluorescent-protein"-*egfp*-Gens.

Beispiel 3: Konstruktion des *Saccharomyces-cerevisiae*-Stammes mit integrierter zytotoxischer und genotoxischer Signalgebung

3.1. Konstruktion des *pma1-DsRed1* und *rad54-gfp* exprimierenden *Saccharomyces-cerevisiae*-Stammes: In dem Plasmid *p774-pma1-DsRed1* (siehe Beispiel 1, Fig. 3) sind zur gerichteten homologen Rekombination des klonierten Inserts in den chromosomalen Locus des *LEU2* Gens (Chromosom III) in *Saccharomyces cerevisiae* 5' 476 bp und 3' 573 bp als flankierende Regionen des *LEU2* Gens inseriert. Zur gerichteten Integration des Gesamtplasmids einschließlich des 1,63 kb *pma1-DsRed1* Verbundfragments am chromosomalen Locus des *LEU2* Gens wurde mit der Restriktionsendonuklease *Not I* eine Linearisierung des Plasmids *p774-pma1-DsRed1* an Position 3780 (bezogen auf Originalplasmid, siehe Fig. 2), zwischen den flankierenden *LEU2* Regionen eingeführt.

Das erhaltene lineare 8,25 kb *Not I* DNA Fragment wurde nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese und Isolierung aus der Gelmatrix zur Transformation des *pdr5yor1snq2* dreifach-mutanten *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefestammes, in dem die hauptsächlichen hefe-eigenen, für die endogene Resistenz verantwortlichen ABC-Transporter Gene für Xenobiotikatranslokations-Systeme spezifisch deletiert sind, verwendet. Dazu wurden aus Einzellen stammende Kolonien (Hefe-Transformanten) auf den in dem Plasmid *p774* ebenfalls enthaltenen biosynthetischen Marker *LEU2* (*LEU2*⁺ Protrophie) selektioniert.

Die Transformation des *pdr5yor1snq2* dreifach mutanten *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefestammes mit dem *DsRed1* Gen unter Kontrolle des *pma1* Promotors führte zur Isolierung eines *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefewirts-

stamms, in dem die hauptsächlichen hefe-eigenen für die endogene Resistenz verantwortlichen ABC-Transporter Gene für Xenobiotikatranslokationssysteme spezifisch deletiert sind und das *DsRed1* Gen am chromosomalen Locus des biosynthetischen *LEU2* Gens stabil integriert und unter Kontrolle des hefe-eigenen *pma1* Promotors exprimiert ist (Genotyp *MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2⁺ pdr5-Δ1::hisG snq2::hisG yor1-1::hisG leu2::pma1-DsRed1 LEU2*). Bei sich mitotisch vermehrenden Zellen wird das Konstrukt zur zytotoxischen Signalgebung auf die Nachkommenschaft vererbt. Die Expression des *DsRed1* Gens wird nach Anzucht einer Hefekultur durch eine rote Fluoreszenz nach spektraler Anregung bei 558 nm mit einem Emissionsmaximum bei 583 nm sichtbar.

In dem Plasmid *pBSKII-prerad54-egfp-URA3-postrad54* (siehe Beispiel 2, Fig. 4) sind zur gerichteten homologen Rekombination des klonierten Inserts *egfp-URA3* am chromosomalen Locus des *RAD54* Gens (Chromosom VII) in *S. cerevisiae* 5' 1,3 kb flankierende *prerad54* und 3' 0,4 kb flankierende *postrad54* Regionen inseriert. Zur gerichteten Integration der *prerad54-egfp-URA3-postrad54* Kassette am chromosomalen Locus des *RAD54* Gens wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Not I/Pvu II* ein 3,62 kb Fragment aus dem Plasmid *pBSKII-prerad54-egfp-URA3-postrad54* gespalten.

Das erhaltene 3,62 kb *prerad54-egfp-URA3-postrad54* Fragment wurde nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese und Isolierung aus der Gelmatrix zur Transformation des Hefestammes mit zytotoxischer Signalpotenz (Genotyp *MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2⁺ pdr5-Δ1::hisG snq2::hisG yor1-1::hisG leu2::pma1-DsRed1 LEU2*) verwendet. Dazu wurden aus Einzellen stammende Kolonien (Hefe-Transformanten) auf den in der Kassette enthaltenen biosynthetischen Marker *URA3* (*URA3⁺* Protrophie) selektioniert.

Die Transformation des *pdr5yor1snq2* dreifach-mutanten *Saccharomyces cerevisiae*-Hefe-stammes mit integriertem *DsRed1* Gen unter Kontrolle des

pma1 Promotors mit der *prerad54-egfp-URA3-postrad54* Kassette führte zur Isolierung des *Saccharomyces cerevisiae* Hefewirtsstamms HLY5RG-12B2, in dem

1. die hauptsächlichen hefe-eigenen für die endogene Resistenz verantwortlichen ABC-Transporter Gene für Xenobiotikatranslokations-Systeme spezifisch deletiert sind, und
2. das *DsRed1*-Gen am chromosomalen Locus des biosynthetischen *LEU2* Gens stabil integriert und unter Kontrolle des hefe-eigenen *pma1* Promotors zur zytotoxischen Signalgebung exprimiert ist, und
3. das *egfp*-Gen am chromosomalen Locus des *RAD54* Gens stabil integriert und unter Kontrolle des hefe-eigenen *rad54* Promotors zur genotoxischen Signalgebung exprimiert ist (Genotyp *MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2⁺ pdr5-Δ1::hisG snq2::hisG yor1-1::hisG leu2::pma1-DsRed1 LEU2 rad54::egfp-URA3*). Anstelle des *RAD54* Gens wird in diesem *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm ausschließlich das *egfp* Gen exprimiert. Bei sich mitotisch vermehrenden Zellen werden beide Konstrukte zur zytotoxischen und genotoxischen Signalgebung auf die Nachkommenschaft vererbt. Die Expression des *egfp* Gens wird nach Anzucht einer Hefekultur und Induktion der biochemischen, „*RAD54*“, vermittelten Signaltransduktionskaskade durch eine grüne Fluoreszenz nach spektraler Anregung bei 488nm mit einem Emissionsmaximum bei 508 nm sichtbar.

3.2 Charakterisierung des *pma1-DsRed1* und *rad54-gfp* exprimierenden *Saccharomyces-cerevisiae*-Stammes durch PCR-Analyse: Die korrekte Integration des *p774-pma1-DsRed1* Plasmids und der *egfp-URA3* Kassette am jeweiligen chromosomalen *LEU2* bzw. *RAD54* Locus des *Saccharomyces-cerevisiae*-Genoms, Genotyp *MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2⁺ pdr5-Δ1::hisG snq2::hisG yor1-1::hisG leu2::pma1-DsRed1 LEU2 rad54::egfp-URA3* wurde mit PCR Analysen nachgewiesen.

Als Matrize wurde von der mit Standardmethoden isolierten genomischen DNA aus vier verschiedenen selektionierten Hefe-Einzelkolonien 20 pg ein-

gesetzt.

Die korrekte Integration des p774-*pma1-DsRed1* Plasmids am chromosomalen *LEU2*-Locus wurde mit einem Oligonukleotid, welches komplementär zum kodierenden Strang des inserierten *pma1* Promotors ist, in "sense" Richtung, und einem Oligonukleotid, welches stromabwärts außerhalb der inserierten flankierenden *LEU2* 3'-Region komplementär zum kodierenden Strang ist, in "antisense" Richtung (Primer *pma1-158_antisense* und *Leu2int_antisense*) nachgewiesen.

Dadurch sollte ein 0,8 kb spezifisches DNA Fragment amplifiziert werden. Zur Kontrolle des Reaktionsgemisches wurde eine Reaktion ohne Matrize durchgeführt (Wasserkontrolle, Gelspur 7 in Fig. 5A). Zur Kontrolle des korrekten Amplifikationsproduktes wurde 20 pg des *pdr5yor1snq2* dreifach mutanten *Saccharomyces-cerevisiae*-Ausgangsstammes eingesetzt (Negativkontrolle, Gelspur 6 in Fig. 5A). In Fig. 5A sind die Reaktionsansätze mit der isolierten DNA von vier verschiedenen Hefe-Einzelkolonien durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Gelspur 1 enthält den Molekulargewichtsmarker (Nr. VII, MBI Fermentas), Gelspur 2 den Reaktionsansatz des analysierten Hefe-Klons 1, der keine spezifische Amplifikation erkennen lässt, Gelspuren 3 - 5 die Reaktionsansätze der analysierten Hefe-Klone 2, 3 und 4, die die spezifische Amplifikation des gewünschten Sollproduktes von 0,8 kb zeigen und damit die erfolgreiche Integration des p774-*pma1-DsRed1* Plasmids am chromosomalen *LEU2*-Locus in den Hefe-Einzelkolonien 2, 3 und 4 bestätigen.

Die korrekte Integration der *egfp-URA3* Kasette am chromosomalen *RAD54* Locus des *Saccharomyces-cerevisiae*-Genoms wurde mit der DNA der zuvor bestätigten Hefe-Klone 2, 3 und 4 als Matrize und mit einem Oligonukleotid, welches komplementär zum kodierenden Strang des biosynthetischen Marker-Gens *URA3* ist, in "antisense" Richtung, und einem Oligonukleotid, welches stromaufwärts außerhalb der inserierten flankierenden *RAD54* 5' Region homolog zum kodierenden Strang ist, in "sense" Richtung (Primer pre-

rad_sense_int1 und ura3_antisense) nachgewiesen.

Dadurch sollte ein 2,3 kb spezifisches DNA-Fragment amplifiziert werden. Zur Kontrolle des Reaktionsgemisches wurde eine Reaktion ohne Matrize durchgeführt (Wasserkontrolle, Gelspur 6 in Fig. 5B). Zur Kontrolle des korrekten Amplifikationsproduktes wurde 20 pg des *pdr5yor1snq2* dreifach mutanten *Saccharomyces-cerevisiae*-Ausgangsstammes eingesetzt (Negativkontrolle, Gelspur 5 in Fig. 5B). In Fig. 5B sind die Reaktionsansätze mit der isolierten DNA der zuvor bestätigten Hefe-Einzelkolonien 2, 3 und 4 durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Gelspur 1 enthält den Molekulargewichtsmarker (Nr. VII, MBI Fermentas), Gelspuren 2 – 4 die Reaktionsansätze der analysierten Hefe-Klone 2, 3 und 4, von denen nur der Hefe-Klon 3 eine spezifische Amplifikation des gewünschten Sollproduktes von 2,3 kb zeigt und damit die erfolgreiche Integration der *egfp-URA3* Kassette am chromosomalen *RAD54* Locus des *Saccharomyces cerevisiae* Genoms des Hefe-Klons 3 bestätigt.

Diese isolierte Hefe-Einzelkolonie mit dem Genotyp Genotyp *MATa ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 his3-Δ200 GAL2⁺ pdr5-Δ1::hisG snq2::hisG yor1-1::hisG leu2::pma1-DsRed1 LEU2 rad54::egfp-URA3* erhielt die Bezeichnung HLY5RG-12B2 und wurde am 5.12.00 als Glycerinkultur bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellstrukturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland, gemäß der Richtlinien des Budapester Vertrags unter der Bezeichnung DSM 13954 hinterlegt.

3.3 Charakterisierung des *DsRed1* und *egfp* exprimierenden *Saccharomyces-cerevisiae*-Stammes durch Wachstums- und Fluoreszenztests in Gegenwart von Inhibitoren:

Kulturen von *Saccharomyces-cerevisiae*-Wildstamm, des *pdr5yor1snq2* dreifach-mutanten Hefestammes und des zytotoxisch und genotoxisch signalgebenden, *Dsred* und *egfp* exprimierenden Stammes HLY5RG-12B2 wurden im Vollmedium YPD (2 % Hefeextrakt, 1 % Pepton) mit 2 % D-Glucose,

pH 5.0 bei 30° C über Nacht unter Schütteln angezogen.

Von jedem Stamm wurden 1×10^5 Zellen unter selektiven und inhibitorischen Bedingungen (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% NH_4SO_4 , 2% D-glucose, pH 5.0 Grundmedium, für den *pdr5yor1snq2* dreifach-mutanten Hefestamm supplementiert mit Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil á 20 µg/l, für den Hefestamm HLY5RG-12B2 supplementiert mit Tryptophan und Histidin á 20 µg/l) mit 0.05 ng/ml und 0.5 ng/ml Mitomycin C sowie 0.01 ng/ml und 0.1 ng/ml TPhT (Tri-phenyl-Zinn) bei 30° C für 8 Stunden inkubiert. In Figur 6 sind Fluoreszenzsignale von Zellen des konstruierten und isolierten zytotoxisch und genotoxisch signalgebenden Hefestamms HLY5RG-12B2 in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration im Kulturmedium gezeigt. Fig. 7 zeigt das Wachstum von *S.-cerevisiae*-Wildtyp-Zellen und von Zellen des konstruierten Hefestamms HLY5RG-12B2 nach 8 Stunden Inkubation in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration.

Der *Saccharomyces-cerevisiae*-Wildstamm wächst unter den oben genannten Bedingungen inhibitorischen Bedingungen von 0.05 ng/ml und 0.5 ng/ml Mitomycin C sowie 0.01 ng/ml und 0.1 ng/ml TPhT mit normalen Wachstumsraten (Verdopplungszeit 90 min) ohne eine spezifische rote (zytotoxisches Potential) oder grüne (genotoxisches Potential) Fluoreszenz bei Emissionsmaxima von 583 nm anzuzeigen. Aufgrund der normalen Wachstumsraten hat dieser Wildstamm eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz durch stationäre Zellen. Der Hefestamm mit Defekten in drei Xenobiotikatranslokations-Systemen PDR5, YOR1 und SNQ2 (*pdr5yor1snq2*, Dreifach-Mutante) wächst mit niedrigen Wachstumsraten (Verdopplungszeit 180 min) ohne eine spezifische rote (zytotoxisches Potential) oder grüne (genotoxisches Potential) Fluoreszenz bei Emissionsmaxima von 583 nm bzw. 508 nm anzuzeigen. In Abhängigkeit der verwendeten Konzentration des genotoxischen Inhibitors Mitomycin C (genotoxisches Potential, Fig. 6 A und B) wurde eine zunehmende spezifische grüne Fluoreszenz, Emissionsmaxima von 508 nm, aber keine zunehmende rote Fluoreszenz, Emissionsmaxima von 583 nm, detektiert. In Abhängigkeit der verwendeten Konzentration des zytotoxischen Inhibitors TPhT (zytotoxisches Potential, Fig. 6,

C und D) wurde eine zunehmende spezifische rote Fluoreszenz, Emissionsmaxima von 583 nm, aber keine zunehmende grüne Fluoreszenz, Emissionsmaxima von 508 nm, detektiert.

Damit wurde die selektive Detektion zytotoxischen und genotoxischen Potentials verschiedener Substanzen im *S. cerevisiae* Stamm HLY5RG-12B2 bestätigt.

Beispiel 4: Zytotox- und Genotox-Testverfahren unter Verwendung von HLY5R

Zur zyto- und genotoxischen Substanzprüfung wurde eine Flüssig-Vorkultur des *Saccharomyces-cerevisiae*-Hefestammes HLY5RG-12B2 in 5 ml Volumen, bestehend aus YNB Medium (1,7 g/l "Yeast Nitrogen Base" ohne Aminosäuren), 5 g/l NH_4SO_4 , 2% D-Glucose, 0,5g/l Aminosäure-Mix (bestehend aus: 250 mg Adenin, 500 mg Tryptophan, 100 mg Arginin, 100 mg Methionin, 150 mg Tyrosin, 150 mg Lysin, 300 mg Valin, 500 mg Threonin, 500 mg Serin, 250 mg Phenylalanin, 100 mg Asparagin, 10 mg Glutaminsäure, 100 mg Histidin)), pH 5.9 bei 30° C über Nacht (12 – 18 h) unter Schütteln (180 rpm) angezogen. Die Zellen befanden sich dann in der logarithmischen Wachstumsphase, ein Aliquot wurde mikroskopisch kontrolliert und die Zellzahl ausgezählt.

Von diesem vorkultivierten Stamm wurden 1×10^5 Zellen/ml zum Test im gleichen Medium inokkultiert. Für die genotoxischen Substanzprüfungen wurde eine Eichreihe mit vier verschiedenen Konzentrationen Mitomycin C, beginnend bei 0.05 ng/ml und endend bei 0.5 ng/ml angelegt. Für die zytotoxischen Substanzprüfungen wird eine Eichreihe mit vier verschiedenen Konzentrationen TPhT (Tri-phenyl-Zinn), beginnend bei 0.01 ng/ml und endend bei 0.1 ng/ml angelegt.

Von zu prüfenden wässrigen Lösungen wurden Verdünnungen in absteigender Konzentration in 10er Schritten in geeignetem Lösungsmittel

hergestellt (mindestens 10 pro zu prüfender Lösung) und zu den vorgelegten Zellen in Kultivierungsröhrchen (1 - 10 ml) oder Mikrotiterschalen-Kavitäten (50 - 200 µl) gegeben.

Von zu prüfenden Festsubstanzen wurden definierte Mengen abgewogen (ng - µg - mg Bereich) und zu den vorgelegten Zellen in Kultivierungsröhrchen (1 - 10 ml) oder Mikrotiterschalen-Kavitäten (50 - 200 µl) gegeben, oder definierte Lösungen (in Prozent oder in g/l) in geeignetem Lösungsmittel hergestellt und ebenfalls zu der vorgelegten Zellsuspension gegeben.

Zur Kontrolle wurde eine Anzahl Kultivierungsröhrchen (1 - 10 ml) oder Mikrotiterschalen-Kavitäten (50 - 200 µl) mit vorgelegten Zellen ohne jede zu prüfende Substanz oder Lösung pipettiert.

Alle so vorbereiteten Kultivierungsröhrchen (1 - 10 ml) oder Mikrotiterschalen-Kavitäten (50 - 200 µl) wurden für 8 Stunden bei 30° C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert.

Anschließend wurde für die genotoxische Substanzprüfung eine spektrale Anregung bei 489nm durchgeführt und die Intensität der Emissionsmaxima bei 508 nm (spezifisch für *egfp*) aller Zellsuspensionen gemessen. Diese Daten wurden protokolliert und ausgewertet unter Einbeziehung der entsprechenden Eichreihe sowie der Kontrollreihe.

Für die zytotoxische Substanzprüfung wurde eine spektrale Anregung bei 558nm durchgeführt und die Intensität der Emissionsmaxima bei 583 nm (spezifisch für *DsRedp*) aller Zellsuspensionen gemessen. Außerdem wurde eine Bestimmung des einfachen Wachstums der Zellen durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm durchgeführt. Diese Daten wurden protokolliert und ausgewertet unter Einbeziehung der entsprechenden Eichreihe sowie der Kontrollreihe.

Patentansprüche

1. Modifizierter Hefestamm in dem

(1) eine Genotox-Kassette, umfassend einen ersten Promoter, der durch genotoxische Agentien induzierbar ist, und ein erstes Reportergen, das funktional mit dem ersten Promoter verknüpft ist, und

(2) eine Zytotox-Kassette, umfassend einen zweiten Promoter, der durch zytotoxische Agentien induzierbar ist, und ein zweites Reportergen, das funktional mit dem zweiten Promoter verknüpft ist,

wobei die Promoter und Reportergene in (1) und (2) voneinander verschieden sind,

stabil und funktional in das Genom eines Hefewirtsstammes integriert sind.

2. Hefestamm nach Anspruch 1, wobei der Hefewirtsstamm aus der Gattung *Ascomycota* ist und insbesondere ein *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm ist.

3. Hefestamm nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Hefestamm durch Disruption oder Deletion einer oder mehrerer der in dem Hefewirtsstamm vorhandenen Xenobiotikatranslokationsgene sensibilisiert ist.

4. Hefestamm nach Anspruch 1, wobei die Xenobiotikatranslokationsgene ausgewählt sind aus PDR5, YOR1, SNQ2, YCF1, PDR10, PDR11 und PDR12 und insbesondere wenigstens das PDR5-Gen, besonders bevorzugt das PDR5-, YOR1- und SNQ2-Gen deletiert ist.

5. Hefestamm nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei

(i) der erste Promoter ein Promotor ist, der durch genotoxische Agentien induziert wird und Reparaturmechanismen ansteuert, die als Folge von primären DNS-Schäden aktiviert werden, vorzugsweise ein Promotor zur Regulation von Gen- oder Zellreparaturgenen ist und besonders bevorzugt ein Promoter der Rad-Gene oder der Heat-Schock-Gene ist; und/oder

(ii) der zweite Promoter ein Promotor ist, der die konstitutive Expression von Haushaltsgenen reguliert und durch zytotoxische Agenzien deaktiviert wird, und insbesondere ein Promoter eines Tubulins oder eines Stoffwechsellzyms ist; und/oder

(iii) das erste und zweite Reporteragen ausgewählt sind aus Fluoreszenzmarkern, Enzymen oder Antigenen und insbesondere zwei nicht interferierende Fluoreszenzmarker sind.

6. Hefestamm nach Anspruch 5, wobei der erste Promoter ein Rad-54-Promoter ist, das erste Reporteragen ein grün-fluoreszierendes Protein, insbesondere GFP aus *Aequorea victoria* oder eine Mutante desselben ist, der zweite Promoter ein Leu2-Promoter ist und das zweite Reporteragen ein rot-fluoreszierendes Protein, insbesondere Dsred aus *Dicostoma* oder eine Mutante desselben ist.

7. Hefestamm nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Gentox-Kassette und/oder die Zytox-Kassette weiterhin noch funktionelle DNA-Sequenzen oder funktionelle Gene, insbesondere Selektions-/Markergene, Rekombinase-Erkennungssequenzen und/oder Spleißstellen enthalten.

8. Hefestamm nach Anspruch 1, wobei der Hefestamm eine *Saccharomyces cerevisiae*-Mutante *pdr5yor1snq2 LEU2::pma1-Dsred RAD54::gfp* ist und insbesondere HLY5RG-12B2 (DSM 13954) ist.

9. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Hefestamms gemäß Ansprüchen 1 bis 8, umfassend das Integrieren einer Genotox- und einer Zytox-Kassette in einen Hefewirtsstamm.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei weiterhin eines oder mehrere Xenobiotikatranslationsgene disruptiert oder deletiert werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Gentox- und Zytox-Kassetten in das Genom eines *Saccharomyces cerevisiae pdr5yor1snq2* Hefewirtsstammes integriert werden.
12. Ein Verfahren zur Detektion umweltrelevanter Noxen, umfassend:
 - (a) die Behandlung eines modifizierten Hefestammes gemäß Ansprüchen 1 bis 8 mit einer Testsubstanz oder einem Testsubstanzgemisch;
 - (b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Beendigung der Behandlung mit der Testsubstanz/dem Testsubstanzgemisch, und
 - (c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme der Reportergenaktivität des Hefestammes in Anwesenheit oder nach Beendigung der Behandlung mit der Testsubstanz/dem Testsubstanzgemisch.
13. Ein Verfahren nach Anspruch 12, welches zur Detektion von genotoxischer Substanzen und/oder zytotoxischer Substanzen geeignet ist.
14. Verwendung eines modifizierten Hefestamms nach Ansprüchen 1 bis 8 zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen.
15. Testkit und Biosensor zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen, umfassend einen modifizierten Hefestamm nach Ansprüchen 1 bis 8.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Lichtenberg-Fraté, Hella

<120> Hefestamm zur Prüfung der Geno- und Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen

<130> 013066wo/JH/ml

<140>

<141>

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1275

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> promoter

<222> Complement((1)..(1275))

<400> 1

cagttataag	gaaatatata	tggtaccttg	aaatagagct	aagttctgag	cgtttgattt	60
ttctatactt	tcgtagcagc	tttagtgaag	aaagagaaaa	gttgctgctc	tagattttgt	120
atcggctatt	acgtcaagt	agaagagttt	tggccttcgc	ttcagttaga	tcttctatta	180
tttccttttt	tttctttttg	tttgtaattg	tttttttatt	ttttttttgc	gcgaaacttt	240
gctatattgg	gtaacgcgta	aaatactttt	tattattgca	gtaaggcgga	agggctcttc	300
cctttgcatg	ttaaatagca	tacatggcac	cactcaggtc	cagaacgtga	cacatctttg	360
caccacttgt	gtattttcaa	gatgttaa	ttttgataca	taagctttat	catgcagggtg	420
cagtagacgc	atttgcgtac	gcgttgagta	gtaatgcaag	aacgcaacaa	tttcacgctt	480
tctacttaag	aggacagatc	ttcgagcaga	atatttttct	cctagcgcg	ctttcagaat	540
cttcttacca	tctgcaggac	atcacatgca	agcacatgaa	gctggaacca	cgcaccatta	600
aatgtaaacc	tacagacata	gctagcacag	aaatgctact	ttggaaacct	cggttgcatc	660
ggctgacctc	ggctgttcag	caacgtgagc	tggttggtgt	tattgttc	agaatcctgt	720
attttaccag	tgtagctttg	tccgcccacc	ccacgctttt	ggccactagt	atgtacgtat	780
atgcgtgggc	tctatatcat	tgaaaacgaa	ttttccacgc	aaaaccact	tcacaccata	840
aaggccttat	gacgatgtac	attcttcccc	tccccctcc	tcccgaagga	acccttatag	900
tgatccta	acggtataac	gtaaaccgga	gttgtagca	gagagaagcg	aataatatgt	960
tttgctggg	gttccacaga	gcggcaggaa	ccgtagcgca	ttgaaaaatg	aatcatcgat	1020
catctttggg	tttcaagggt	tcggacttcg	ccaaagggtc	gaatacttcc	accagtattt	1080
ctctttttcc	ctttccagtc	tcgttcttcg	cogaatcccc	gctttcccat	catgatcggt	1140
tctctgtttc	tctctttccg	gaacaggctc	ttttctgacc	gccagttcgt	gcggttagtt	1200
ctgtggatct	tgcaggcact	tgcgggttta	gccacacttc	tccgctgttt	gtgtcgaatt	1260
tccctcgagt	atgag					1275

<210> 2

<211> 345

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(345)

<400> 2

ttatattatga	aaattggcct	gtaaatatat	acataaataa	atatatgcgt	caagctcttt	60
tattcggttt	gtccagta	cctcttacaa	tatatata	tatatatacg	catgtagcgt	120
attcaagaac	attacattta	aaaaatagag	ggtagaacaa	taaaaatgca	cttaacaagt	180
tccgtaagta	gaaattataa	tcagtctaag	tacaaattta	taccttagct	tcatttcagt	240
taagggcgat	gcaataaaa	tggaagaaaa	aaaaagaagg	gaagagggtt	gataatatat	300

atatatatat atatataaca ttgctcagag aaacatacat cagtg

345

<210> 3
<211> 438
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(438)

<400> 3
taaagtgacc tggctctata gtgttgctcc tctcgcgagg accattgttg cttgcatatg 60
gcttgaaaca tatgtcatca catctgagcg attttacctc ttagaattag tttagatata 120
tatgagttga tgaataaata gttataaaaa cttgctttgg cttcgatata tgaccgttat 180
ttttgactaa gttttaacga aggaatctaa cctcgttctt gtaattacca aaatcttcaa 240
caacgcgctg ttggaggtat ctctatggat gtggcttgaa atatggatgt cttgcctact 300
tctacttctg ggaaaggcat ttttactcga tgcggttaat atatgcatca agaaaataaa 360
aaataaaaacg cgaagagcta aaaaaaaaaa agaaaaccta ctataaataa ccgattagaa 420
tcgagttttt gtattgaa 438

<210> 4
<211> 209
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(209)

<400> 4
cttttttttt ttttttttat agcacgcaac tgaaaaaaaa aaaaagaaaa atttttcac 60
ttcgcctgac gtttcttttg tagtactcat ctctttttat ataaagatta attagttatt 120
gtcgcctttg ttttcttctt ttaaaaaaat tttcttgctt ttggattttc agatgtccca 180
agatcattac agtattttaa ttgaacaaa 209

<210> 5
<211> 361
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(361)

<400> 5
tatcacattc cggagtgtca cccccctct ctcaacacag taatccataa accagtttta 60
catcacgta aaaaagaaca ggaataaagc ttaatcggat tattaactca tacgcttgct 120
acatattggt cgaacaattc tggttctttc gagtttcgca gaacttttg aatttttctt 180
ttttttctag aacgcogtgg aagaaaaaca cgcgcatggt tttatgagcg gtaattctc 240
atcttaatac caaccaggtc cttccgccac cccctaaaac atataaatat gcagcttatc 300
ccttcaattc ttaacatctg tgacctctc atttcttccc gctgtattag agttcaagaa 360
a 361

<210> 6
<211> 358
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(358)

<400> 6
 cacaattgca tactttttcca ttataactga ctgttttcaga tcctgcaata gaaagtattt 60
 ttttaagtaat gaaatagtgcc ttccattgat agtaagtgcg taataagacg atcggaaact 120
 attaataataa gtatagttaa catatatata tatatatatg tgccagacga taatatcacc 180
 gtagttttccg gccgggttat gccacgcgaa aacgcctcga gccaaaggaa aaactaaact 240
 acaaaaacaaa acaaaaacaaa acaaaaacat ctactatata gttttaccca attcagtata 300
 tccgtctaca acagtttctcg ccaccaaga tctgtaaaact tacaactgca aacaaaca 358

<210> 7
 <211> 559
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(559)

<400> 7
 ggtnacctca cgtcatggaa attttcgcct tattcatggt gttgggtatc ttcacaacct 60
 tgttgatccc agaaactaag agaaagactc tagaagaaat taacgagcta taccacgatg 120
 aaatcgatcc tgctacgcta aacttcagaa acaagaataa tgacattgaa tcttccagcc 180
 catctcaact tcaacatgaa gcataaaaagc ctcaaagatg cactaaaact tgtaaaactag 240
 acaataaat acaaaaacat ttttataaac ttattatcaa accccttaca taatctataa 300
 atactgtcag gttacatatt tattcgataa tttcttttaa tttcattatt tcctcacatc 360
 tctctgccat cctgttggct ggtgccagag cagagcatat cgtcctttct tttttagttc 420
 cagacgttac ccgacatata atttctcgag cctctggaaa ccacgaaacg ttttacaact 480
 tgcacatcta aaagaaatat aaacacagat caggtatctc ataaagtaca ttaatcgact 540
 aagcaagcga cttgagaca 559

<210> 8
 <211> 939
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(939)

<400> 8
 aagcttcctg aaacggagaa acataaacag gcattgtgtg gatcacccat acatcaactct 60
 gttttgcctg accttttccg gtaatttgaa aacaaacccg gtctcgaagc ggagatcccg 120
 cgataattac cgcagaaata aaccataaca cgagacgtag aaccagccgc acatggcccg 180
 agaaactcct gcgagaattt cgtaaacctg cgcgcattgc atctgtattt cctaagtcgg 240
 cacttccagg cctcgagacc tctgacatgc ttttgacagg aatagacatt ttcagaatgt 300
 tatccatag cctttcgggt ttttttcctt ccttttccat catgaaaaat ctctcgagac 360
 cgtttatoca ttgctttttt gttgtctttt tccctcgttc acagaaagtc tgaagaagct 420
 atagtagaac tatgagcttt tttgtttct gttttccttt tttttttttt tacctctgtg 480
 gaaattgtta ctctcacact ctttagttcg tttgtttgtt ttgtttatc caattatgac 540
 cgggtgacgaa acgtgggtcca tgggtgggtac cgcttatgct cccctccatt agtttcgatt 600
 atataaaaag gccaaatatt gtgttatctt caaatgtcct atcattatcg tctaactatc 660
 aatttctctt aaattttttt tctttctttt ctataacacc aatagtgaat atcttttttt 720
 cttctatata tacaataaact ttttttttct atcaacctcg ttgataaatt ttttctttta 780
 caatcgttta taatttaatta attggaaaat aaccattttt tctctctttt atacacacat 840
 tcaaaaagaaa gaaaaaaaat ataccccagc tagttaaaaga aaatcattga aaagaataag 900
 aagataagaa agatttaatt atcaacaat atcaatatg 939

<210> 9
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(738)

<400> 9
 caataatcca tcatatacca ttaccctgat tcccatcgaa gaaaaggcgg tgtcccctta 60
 cccgtccgct catgcccaaga gattaattca taaccgctct tccttggatc agaagtgaac 120
 atatgaagtt gcaactacta catacttact accgtagtcc atcatcaagg acccaaacat 180
 tcacgactcc agcgcgccac gttcttcgcc atactgctta acattttggt acgagtgcga 240
 attagggaag tccgatgataa aatagaatat gcgaaaaaga ggaagagcag ccgtgagaaa 300
 aaagaaaaaa aaaggcctaa ggtattctct actccaaaat cgtcgaggga gggcaaaaaga 360
 aatttttttt gtttaaggga attgcgaagt caattgattg atgaagtagc ttctctggaa 420
 aaatggcgga cagacgctgc tcaaataacc gtcgaagggg gaaagggtat cggtggaaac 480
 atattttgtaa gtacataata gtgaatttac ttcttgctcg cgtcccctaa acgtaattgg 540
 cggtgtgatg gtacttcggt atataaagggt gtgtaatatc ctcttttacc atctattatt 600
 tcttccagca tttcttgctg gataacctac tgtatccaag ctactgggct tttttaaaca 660
 taccataaac tttttttttt ttcatttttc gttgctgtgt gctagtacaa ttttaagcaaa 720
 aggaaactgt tttgcgtt 738

<210> 10
 <211> 736
 <212> DNA
 <213> *Aequorea victoria*

<220>
 <221> CDS
 <222> (14)..(727)

<400> 10
 aagctttatt aaa atg tct aaa ggt gaa gaa tta ttc act ggt gtt gtc 49
 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
 1 5 10

cca att ttg gtt gaa tta gat ggt gat gtt aat ggt cac aaa ttt tct 97
 Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser
 15 20 25

gtc tcc ggt gaa ggt gaa ggt gat gct act tac ggt aaa ttg acc tta 145
 Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
 30 35 40

aaa ttt att tgt act act ggt aaa ttg cca gtt cca tgg cca acc tta 193
 Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
 45 50 55 60

gtc act act ttc ggt tat ggt gtt caa tgt ttt gct aga tac cca gat 241
 Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp
 65 70 75

cat atg aaa caa cat gac ttt ttc aag tct gcc atg cca gaa ggt tat 289
 His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
 80 85 90

gtt caa gaa aga act att ttt ttc aaa gat gac ggt aac tac aag acc 337
 Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
 95 100 105

aga gct gaa gtc aag ttt gaa ggt gat acc tta gtt aat aga atc gaa 385
 Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
 110 115 120

tta aaa ggt att gat ttt aaa gaa gat ggt aac att tta ggt cac aaa 433
 Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
 125 130 135 140

ttg gaa tac aac tat aac tct cac aat gtt tac atc atg gct gac aaa 481
 Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys
 145 150 155
 caa aag aat ggt atc aaa gtt aac ttc aaa att aga cac aac att gaa 529
 Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
 160 165 170
 gat ggt tct gtt caa tta gct gac cat tat caa caa aat act cca att 577
 Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
 175 180 185
 ggt gat ggt cca gtc ttg tta cca gac aac cat tac tta tcc act caa 625
 Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln
 190 195 200
 tct gcc tta tcc aaa gat cca aac gaa aag aga gac cac atg gtc ttg 673
 Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
 205 210 215 220
 tta gaa ttt gtt act gct gct ggt att acc cat ggt atg gat gaa ttg 721
 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu
 225 230 235
 tac aaa taactgcag 736
 Tyr Lys

<210> 11
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> *Aequorea victoria*

<400> 11
 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
 50 55 60
 Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
 165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 12
 <211> 859
 <212> DNA
 <213> Discosoma sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (54)..(728)

<400> 12

gtttcagcca gtgacgggtca gtgacagggt gagccacttg gtataccaac aaa atg 56
 Met
 1
 agg tct tcc aag aat gtt atc aag gag ttc atg agg ttt aag gtt cgc 104
 Arg Ser Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg
 5 10 15
 atg gaa gga acg gtc aat ggg cac gag ttt gaa ata gaa ggc gaa gga 152
 Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly
 20 25 30
 gag ggg agg cca tac gaa ggc cac aat acc gta aag ctt aag gta acc 200
 Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val Thr
 35 40 45
 aag ggg gga cct ttg cca ttt gct tgg gat att ttg tca cca caa ttt 248
 Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe
 50 55 60 65
 cag tat gga agc aag gta tat gtc aag cac cct gcc gac ata cca gac 296
 Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp
 70 75 80
 tat aaa aag ctg tca ttt cct gaa gga ttt aaa tgg gaa agg gtc atg 344
 Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met
 85 90 95
 aac ttt gaa gac ggt ggc gtc gtt act gta acc cag gat tcc agt ttg 392
 Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu
 100 105 110
 cag gat ggc tgt ttc atc tac aag gtc aag ttc att ggc gtg aac ttt 440
 Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct tcc gat gga cct gtt atg caa aag aag aca atg ggc tgg gaa gcc 488
 Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala
 130 135 140 145

```

agc act gag cgt ttg tat cct cgt gat ggc gtg ttg aaa gga gag att 536
Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile
      150      155      160

cat aag gct ctg aag ctg aaa gac ggt ggt cat tac cta gtt gaa ttc 584
His Lys Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu Phe
      165      170      175

aaa agt att tac atg gca aag aag cct gtg cag cta cca ggg tac tac 632
Lys Ser Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr
      180      185      190

tat gtt gac tcc aaa ctg gat ata aca agc cac aac gaa gac tat aca 680
Tyr Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr
      195      200      205

atc gtt gag cag tat gaa aga acc gag gga cgc cac cat ctg ttc ctt 728
Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe Leu
      210      215      220      225

taaggctgaa cttggctcag acgtgggtga gcggtaatga ccacaaaagg cagcgaagaa 788

aaaccatgat cgtttttttt aggttggcag cctgaaatcg taggaaatac atcagaaatg 848

ttacaaacag g 859

```

<210> 13
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> *Discosoma* sp.

```

<400> 13
Met Arg Ser Ser Lys Asn Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val
  1      5      10      15

Arg Met Glu Gly Thr Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu
      20      25      30

Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Asn Thr Val Lys Leu Lys Val
      35      40      45

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln
      50      55      60

Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Val Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro
      65      70      75      80

Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val
      85      90      95

Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser
      100      105      110

Leu Gln Asp Gly Cys Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Ile Gly Val Asn
      115      120      125

Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu
      130      135      140

Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu
      145      150      155      160

Ile His Lys Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu
      165      170      175

```

Phe Lys Ser Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr
 180 185 190
 Tyr Tyr Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr
 195 200 205
 Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Thr Glu Gly Arg His His Leu Phe
 210 215 220
 Leu
 225

<210> 14
 <211> 1166
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 <222> (223)..(1023)

<400> 14
 agcttttcaa ttcatctttt ttttttttgt tctttttttt gattccggtt tctttgaaat 60
 ttttttgatt cggtaatctc cgagcagaag gaagaacgaa ggaaggagca cagacttaga 120
 ttggtatata tacgcatatg tgggtgtgaa gaaacatgaa attgccagat attcttaacc 180
 caactgcaca gaacaaaaac ctgcaggaaa cgaagataaa tc atg tcg aaa gct 234
 Met Ser Lys Ala
 1
 aca tat aag gaa cgt gct gct act cat cct agt cct gtt gct gcc aag 282
 Thr Tyr Lys Glu Arg Ala Ala Thr His Pro Ser Pro Val Ala Ala Lys
 5 10 15 20
 cta ttt aat atc atg cac gaa aag caa aca aac ttg tgt gct tca ttg 330
 Leu Phe Asn Ile Met His Glu Lys Gln Thr Asn Leu Cys Ala Ser Leu
 25 30 35
 gat gtt cgt acc acc aag gaa tta ctg gag tta gtt gaa gca tta ggt 378
 Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Leu Val Glu Ala Leu Gly
 40 45 50
 ccc aaa att tgt tta cta aaa aca cat gtg gat atc ttg act gat ttt 426
 Pro Lys Ile Cys Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile Leu Thr Asp Phe
 55 60 65
 tcc atg gag ggc aca gtt aag ccg cta aag gca tta tcc gcc aag tac 474
 Ser Met Glu Gly Thr Val Lys Pro Leu Lys Ala Leu Ser Ala Lys Tyr
 70 75 80
 aat ttt tta ctc ttc gaa gac aga aaa ttt gct gac att ggt aat aca 522
 Asn Phe Leu Leu Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr
 85 90 95 100
 gtc aaa ttg cag tac tct gcg ggt gta tac aga ata gca gaa tgg gca 570
 Val Lys Leu Gln Tyr Ser Ala Gly Val Tyr Arg Ile Ala Glu Trp Ala
 105 110 115
 gac att acg aat gca cac ggt gtg gtg ggc cca ggt att gtt agc ggt 618
 Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Val Gly Pro Gly Ile Val Ser Gly
 120 125 130

ttg aag cag gcg gcg gaa gaa gta aca aag gaa cct aga ggc ctt ttg 666
 Leu Lys Gln Ala Ala Glu Glu Val Thr Lys Glu Pro Arg Gly Leu Leu
 135 140 145
 atg tta gca gaa ttg tca tgc aag ggc tcc cta gct act gga gaa tat 714
 Met Leu Ala Glu Leu Ser Cys Lys Gly Ser Leu Ala Thr Gly Glu Tyr
 150 155 160
 act aag ggt act gtt gac att gcg aag agc gac aaa gat ttt gtt atc 762
 Thr Lys Gly Thr Val Asp Ile Ala Lys Ser Asp Lys Asp Phe Val Ile
 165 170 175 180
 ggc ttt att gct caa aga gac atg ggt gga aga gat gaa ggt tac gat 810
 Gly Phe Ile Ala Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Asp Glu Gly Tyr Asp
 185 190 195
 tgg ttg att atg aca ccc ggt gtg ggt tta gat gac aag gga gac gca 858
 Trp Leu Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly Asp Ala
 200 205 210
 ttg ggt caa cag tat aga acc gtg gat gat gtg gtc tct aca gga tct 906
 Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Asp Val Val Ser Thr Gly Ser
 215 220 225
 gac att att att gtt gga aga gga cta ttt gca aag gga agg gat gct 954
 Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Ala Lys Gly Arg Asp Ala
 230 235 240
 aag gta gag ggt gaa cgt tac aga aaa gca ggc tgg gaa gca tat ttg 1002
 Lys Val Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu Ala Tyr Leu
 245 250 255 260
 aga aga tgc ggc cag caa aac taataaactg tattataagt aaatgcatgt 1053
 Arg Arg Cys Gly Gln Gln Asn
 265

atactaaact cacaaattag agcttcaatt taattatatc agttattacc cggaatctc 1113

ggtcgtaatg atttctataa tgacgaaaaa aaaaaaattg gaaagaaaaa gct 1166

<210> 15

<211> 267

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 15

Met Ser Lys Ala Thr Tyr Lys Glu Arg Ala Ala Thr His Pro Ser Pro
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Leu Phe Asn Ile Met His Glu Lys Gln Thr Asn Leu
20 25 30

Cys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Leu Val
35 40 45

Glu Ala Leu Gly Pro Lys Ile Cys Leu Leu Lys Thr His Val Asp Ile
50 55 60

Leu Thr Asp Phe Ser Met Glu Gly Thr Val Lys Pro Leu Lys Ala Leu
65 70 75 80

Ser Ala Lys Tyr Asn Phe Leu Leu Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp
85 90 95

Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln Tyr Ser Ala Gly Val Tyr Arg Ile
 100 105 110
 Ala Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Val Gly Pro Gly
 115 120 125
 Ile Val Ser Gly Leu Lys Gln Ala Ala Glu Glu Val Thr Lys Glu Pro
 130 135 140
 Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Cys Lys Gly Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Thr Gly Glu Tyr Thr Lys Gly Thr Val Asp Ile Ala Lys Ser Asp Lys
 165 170 175
 Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Asp
 180 185 190
 Glu Gly Tyr Asp Trp Leu Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp
 195 200 205
 Lys Gly Asp Ala Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Asp Val Val
 210 215 220
 Ser Thr Gly Ser Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Ala Lys
 225 230 235 240
 Gly Arg Asp Ala Lys Val Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp
 245 250 255
 Glu Ala Tyr Leu Arg Arg Cys Gly Gln Gln Asn
 260 265

<210> 16

<211> 4692

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor
pDsRed1-N1

<400> 16

```

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360
catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcy gtaggcgtgt 540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta 600
ccggactcag atctcgagct caagcttcga attctgcagt cgacgggtacc gcgggcccgg 660
gatccaccgg tcgccaccat ggtgcgctcc tccaagaacg tcatcaagga gttcatgcgc 720
ttcaaggtgc gcatggaggg caccgtgaac ggccacgagt tcgagatcga gggcgagggc 780
gagggccgcc cctacggagg ccacaacacc gtgaagctga aggtgaccaa gggcgggccc 840
ctgcccttgc cctgggacat cctgtcccc cagttccagt acggctccaa ggtgtacgtg 900
aagcaccgcc ccgacatccc cgactacaag aagctgtcct tccccgaggy cttcaagtgg 960
gagcgcgtag tgaacttcga ggacggcggc gtggtgaccg tgaccaggga ctccctccctg 1020
caggacggct gcttcatcta caagtggaag ttcacgagcg tgaacttccc ctccgacggc 1080
cccgtaatgc agaagaagac catgggctgg gaggcctcca ccgagcgcc gtacccccgc 1140
gacggcgtgc tgaaggcgga gatccacaag gccctgaagc tgaaggacgg cggccactac 1200
ctggtggagt tcaagtcctat ctacatggcc aagaagcccg tgcagctgcc cggctactac 1260
tacgtggact ccaagctgga catcacctcc cacaacgagg actacaccat cgtggagcag 1320

```



```

tacgagcgca cccaggggccc ccaccacctg ttcctgtagc ggccgcgact ctagatcata 1380
atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc 1440
ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta acttgtttat tgcagcttat 1500
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg 1560
cattctagtt gtgggttgtc caaactcatc aatgtatott aaggcgtaaa ttgtaagcgt 1620
taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaato agctcatttt ttaaccaata 1680
ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt 1740
tggtccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg 1800
aaaaaccgtc tatcagggcg atggccactc acgtgaacca tcaccctaata caagtttttt 1860
ggggtcgagg tgccgtaaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc gatttagagc 1920
ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaagggaagg aagaaagcga aaggagcggg 1980
cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcta accaccacac ccgcccgcgt 2040
taatgcggcg ctacagggcg cgtcaggtgg cacttttcgg ggaatgtgc gcggaacccc 2100
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 2160
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtcctgag gcggaagaa ccagctgtgg 2220
aatgtgtgtc agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa 2280
agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaggt cccagggtc cccagcaggc 2340
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgc cctaactccg 2400
cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccatttcc cgccccatgg ctgactaatt 2460
ttttttattt atgcagaggc cagggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagttagta 2520
ggaggctttt ttggaggcct aggccttttc aaagatcgat caagagacag gatgaggatc 2580
gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccgcccgtt gggtagagag 2640
gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggtgc tctgatgcc ccgtgttccg 2700
gctgtcagcg cagggcgccc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgcoctgaa 2760
tgaactgcaa gacgagcga cgcggctatc gtggctggcc acgacggggc ttccttgccg 2820
agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aaaggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc 2880
ggggcaggat ctccctgcat ctccacttgc tcctgcggag aaagtatcca tcatggctga 2940
tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa 3000
acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggg ctgtcgatc aggatgatct 3060
ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgagcat 3120
gcccgcaggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt 3180
ggaaaatggc cgttttctg gattcatoga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta 3240
tcaggacata gcgttggtta cccgtgatat tgctgaagag ctggcgccg aatgggctga 3300
ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcctgattcg cagcgcatcg ccttctatcg 3360
ccttcttgac gagttcttct gagcgggact ctgggggttg aaatgaccga ccaagcgacg 3420
cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgcccgt tctatgaaag gttgggcttc 3480
ggaatcgttt tcogggacgc cggctggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag 3540
ttcttcgccc accctagggg gaggctaact gaaacacgga agggagacaat accggaagga 3600
accctggcta tgacggcaat aaaaagacag aataaaacgc acgggtgttg gtggtttgtt 3660
cataaacgcg ggttcgggtc ccagggtggg cactctgtcg ataccccacc gagaccccat 3720
tggggccaat acgcccgcgt ttcttctttt tccccacccc acccccgaag ttcgggtgaa 3780
ggcccagggc tcgcagccaa cgtcggggcg gcaggccctg ccatagcctc aggttactca 3840
tatatacttt agattgattt aaaaacttcat tttaatttta aaaggatcta ggtgaagatc 3900
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca 3960
gaccocgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgag cgtaactctg 4020
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta 4080
ccaactcttt ttccgaaggc aactgggttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt 4140
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 4200
gctctgctaa tctgttacc agtggtgctt gccagtggcg ataagtctgt tcttaccggg 4260
ttgactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcgt cgggctgaac ggggggttcg 4320
tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 4380
ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggatatc ggtaagcggc 4440
aggttcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 4500
agtctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat tttgtgatg ctgctcaggg 4560
ggcgaggacc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc 4620
tggccttttg ctacatggt ctttctgctg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt 4680
accgcatgc at 4692

```

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 17
gagagctagc agactcgagc tcttacatac atgtacttat aaaac 45

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 18
gagaggtacc agttaagtt aatccttctg agag 34

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 19
gagagcggcc gcctcactact cgagggaat tcg 33

<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 20
gagaggatcc ggtaatctgc gtcttgccat cag 33

<210> 21
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 21
cggctggttc ta 12

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 22
gtcgactacg tcgtaaggc cg 22

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 23
acaaagctcc tctcctgctc aag

23

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: primer

<400> 24
actaggatga gtagcagcac gt

22

Fig. 1

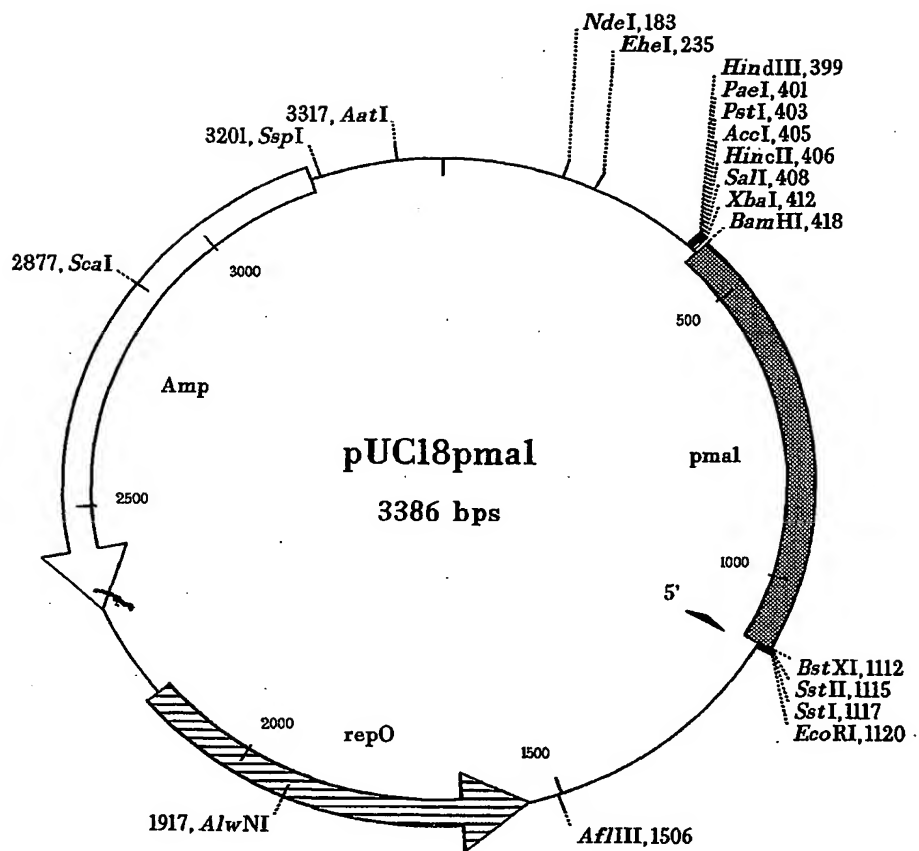
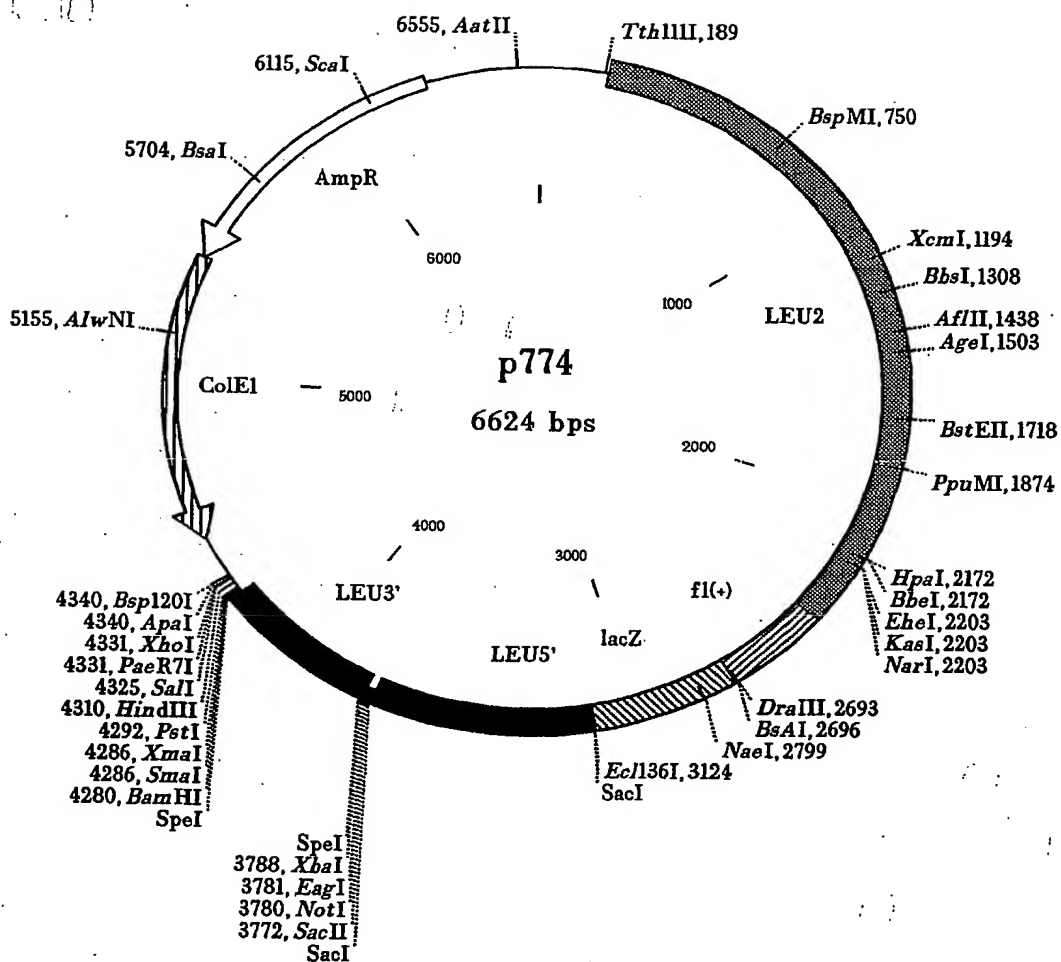


Fig. 2



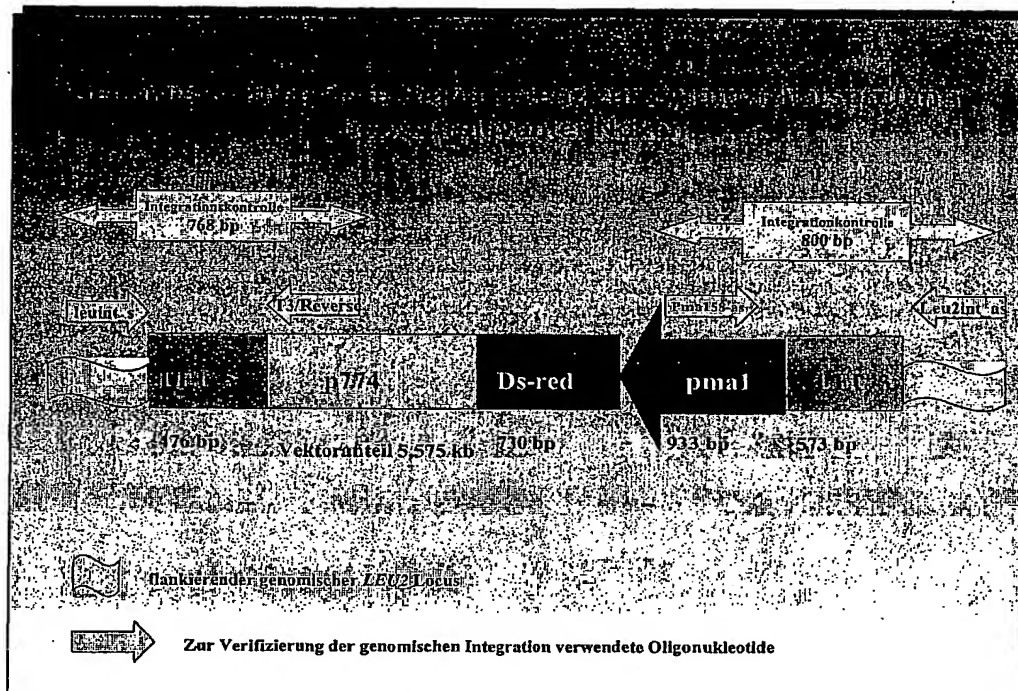
3/7
Fig. 3

Fig. 4

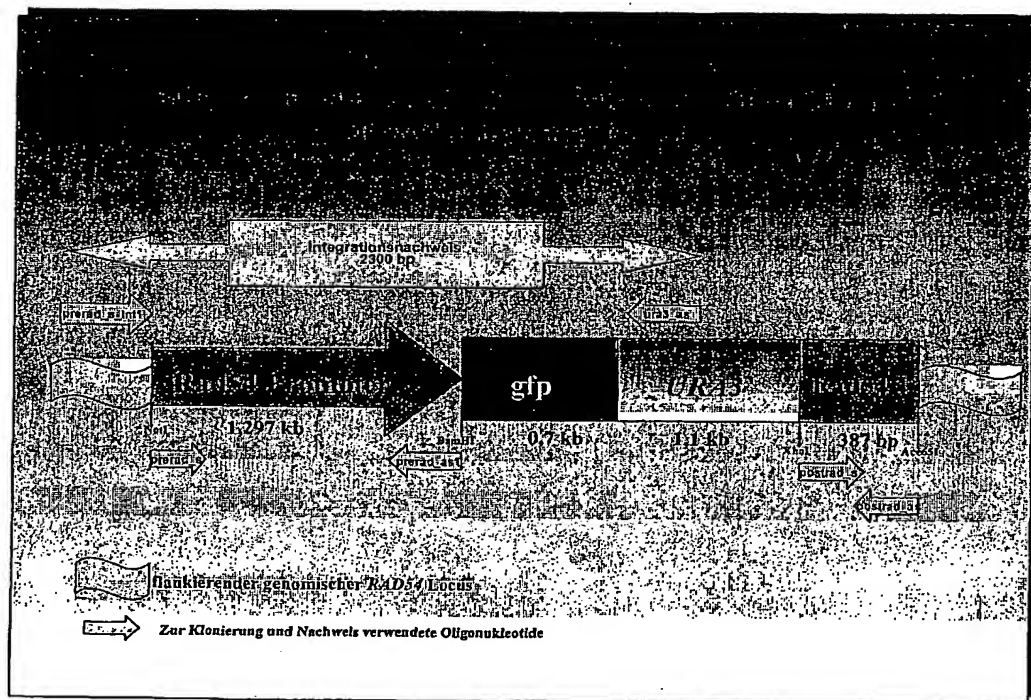


Fig.5

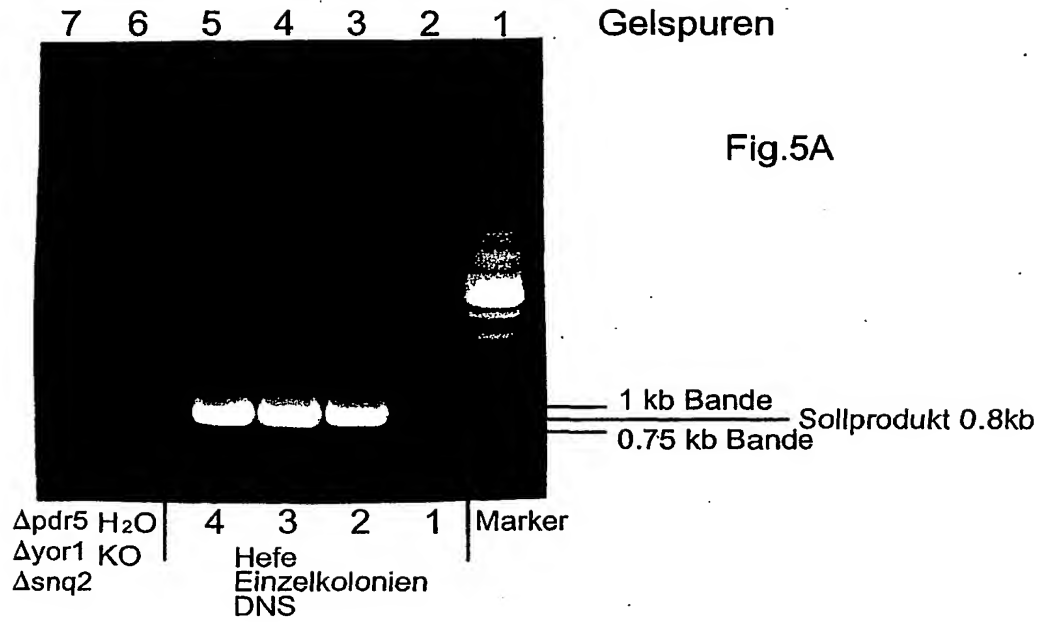


Fig.5A

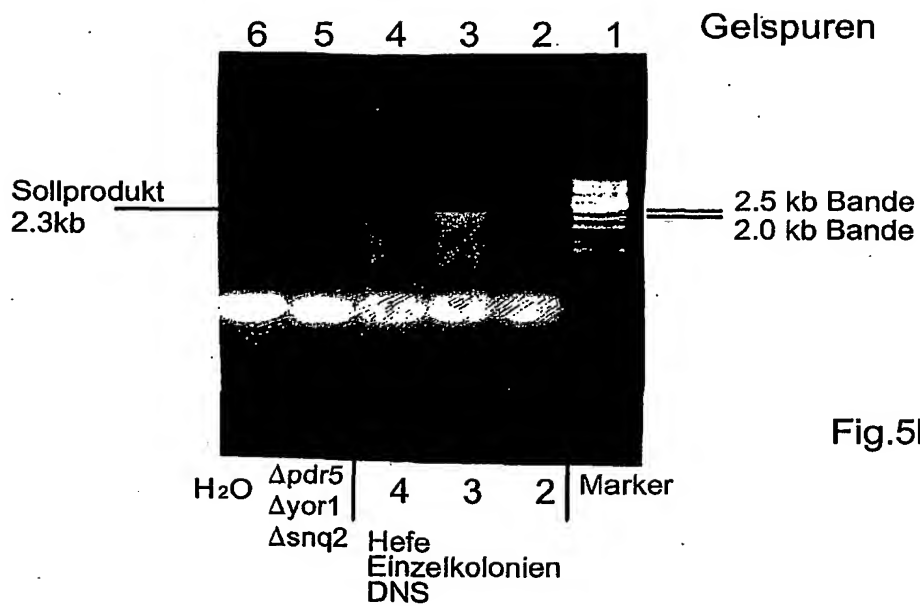
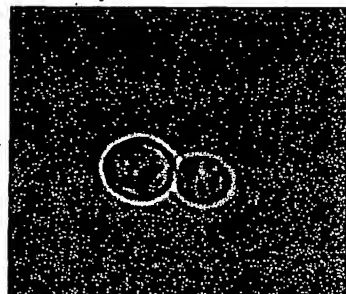


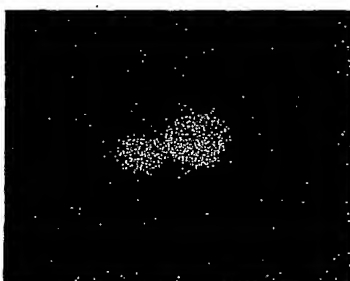
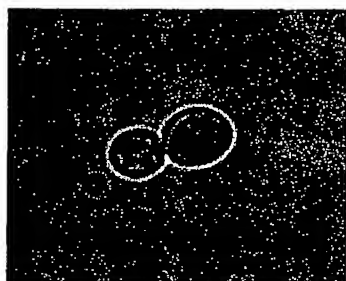
Fig.5B

Fig. 6

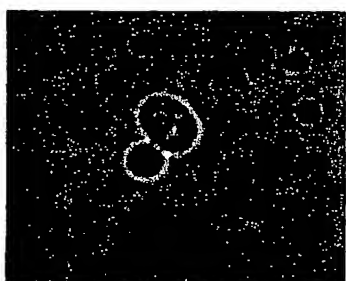
A



B



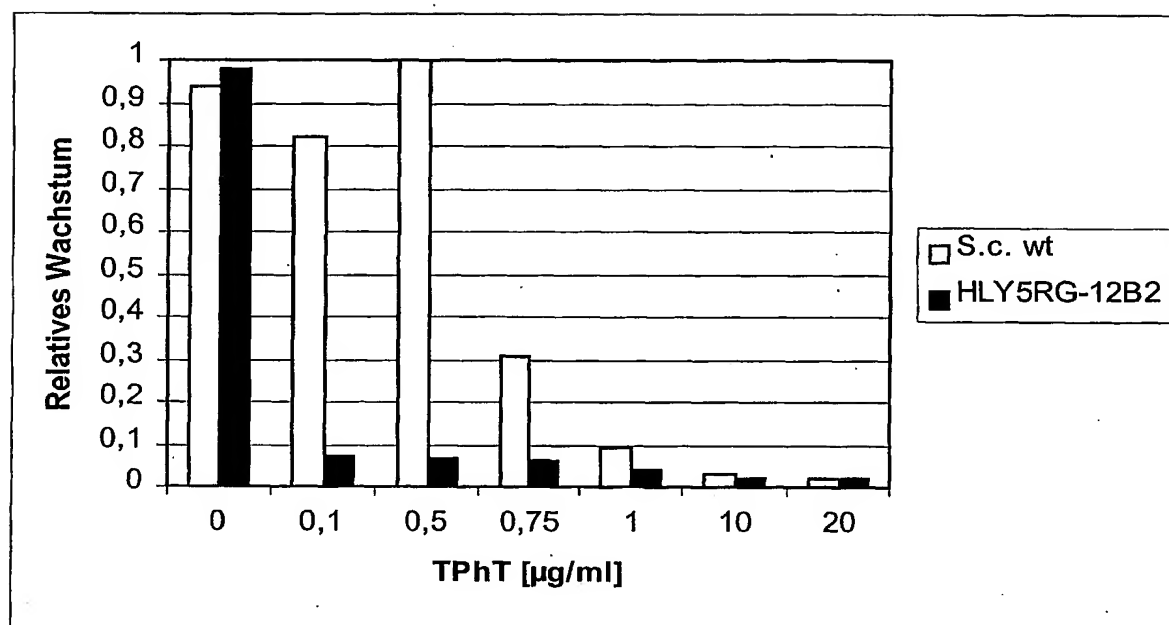
C



D



Fig. 7



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Juni 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/048338 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/81**,
I/18, C12R 1/865, C12Q 1/02 // (C12N I/18, C12R 1:865)

(74) Anwälte: **HELBING, Jörg** usw.; Patentanwälte, Von
Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14610

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Dezember 2001 (12.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 61 872.3 12. Dezember 2000 (12.12.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LICHTENBERG-FRATÉ, Hella** [DE/DE];
Hinter Hoben 165, 53129 Bonn (DE).

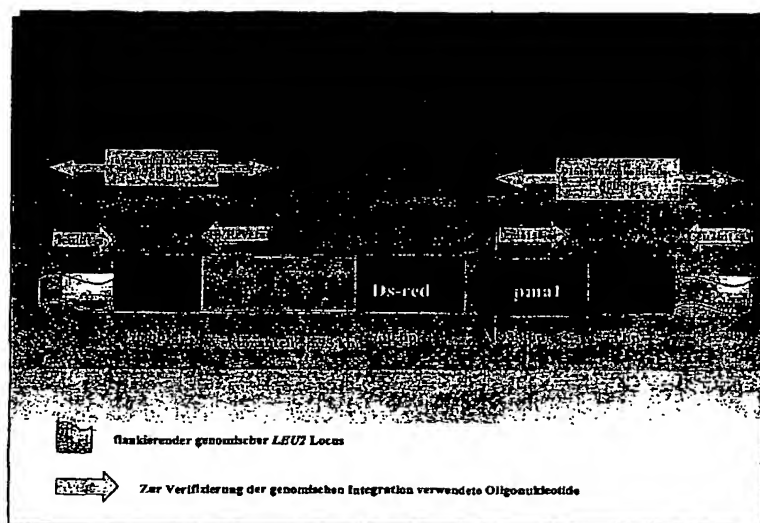
(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

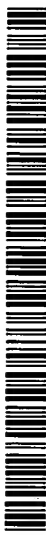
(54) Title: YEAST STRAIN FOR TESTING THE GENO- AND CYTOTOXICITY OF COMPLEX ENVIRONMENTAL CON-
TAMINATION

(54) Bezeichnung: HEFESTAMM ZUR PRÜFUNG DER GENO- UND ZYTOTOXIZITÄT KOMPLEXER UMWELTKONTA-
MINATIONEN



(57) Abstract: The invention relates to modified yeast strains and to methods for constructing yeast strains, as well as to their use for testing the geno- and/or cytotoxicity of complex environmental contamination.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/048338 A3



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

10. April 2003

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft modifizierte Hefestämme sowie Verfahren zur Konstruktion dieser Hefestämme und deren Verwendung zur Prüfung der Geno- und/oder Zytotoxizität komplexer Umweltkontaminationen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/14610

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/81 C12N1/18 C12R1/865 C12Q1/02 //(C12N1/18,
C12R1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 195 49 417 A (DLR DEUTSCHE FORSCHUNGSANSTALT) 5 June 1997 (1997-06-05) the whole document	1
A	WO 99 53092 A (REGNIERS LUC AGNES LOUIS JEAN ;TAGHAVI SAFIYH (BE); VITO (BE); COR) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 2002

Date of mailing of the international search report

27/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alt, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/14610

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19549417	A	05-06-1997	DE 19544374 C1	20-02-1997
			DE 19549417 A1	05-06-1997
WO 9953092	A	21-10-1999	EP 0950717 A1	20-10-1999
			AU 3694499 A	01-11-1999
			WO 9953092 A1	21-10-1999
			BR 9906356 A	19-09-2000
			CN 1263561 T	16-08-2000
			EP 0977896 A1	09-02-2000
			JP 2002509446 T	26-03-2002
			US 6472152 B1	29-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/14610

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/81 C12N1/18 C12R1/865 C12Q1/02 //(C12N1/18,
C12R1:865)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 49 417 A (DLR DEUTSCHE FORSCHUNGSANSTALT) 5. Juni 1997 (1997-06-05) das ganze Dokument	1
A	WO 99 53092 A (REGNIERS LUC AGNES LOUIS JEAN ;TAGHAVI SAFIYH (BE); VITO (BE); COR) 21. Oktober 1999 (1999-10-21) das ganze Dokument	1

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

16. Dezember 2002

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

27/12/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Alt, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/14610

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19549417 A	05-06-1997	DE 19544374 C1	20-02-1997
		DE 19549417 A1	05-06-1997
WO 9953092 A	21-10-1999	EP 0950717 A1	20-10-1999
		AU 3694499 A	01-11-1999
		WO 9953092 A1	21-10-1999
		BR 9906356 A	19-09-2000
		CN 1263561 T	16-08-2000
		EP 0977896 A1	09-02-2000
		JP 2002509446 T	26-03-2002
		US 6472152 B1	29-10-2002